



TITLE:

マイクロ流路の集積化と血液検査
への適用に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

野田, 雄一郎

CITATION:

野田, 雄一郎. マイクロ流路の集積化と血液検査への適用に関する研究.
京都大学, 2013, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2013-11-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k17961>

RIGHT:

マイクロ流路の集積化と血液検査への適用に関する研究

2013 年

野田 雄一郎

目次

第 1 章 緒言	1
1.1 背景	1
1.1.1 マイクロ流路における微量液体の計量	5
1.1.2 マイクロ流路における混合	7
1.1.3 タンパク吸着抑制表面処理	9
1.1.4 血球計数部 マイクロコールターカウンタ	10
1.2 本論文の目的	13
1.3 本論文の構成	15
参考文献	18
第 2 章 微量な血液試料の計量 マイクロディスペンサ	27
2.1 緒言	27
2.2 マイクロディスペンサの構造と設計	31
2.2.1 静的接触角および動的接触角の測定結果	41
2.2.2 マイクロディスペンサの設計	45
2.3 マイクロディスペンサの作製	48
2.4 評価実験と結果考察	52
2.5 結言	58
参考文献	59
第 3 章 マイクロミキサ	61
3.1 緒言	61
3.2 実験	69
3.2.1 質量分布型ミキサの構造と原理	69
3.2.2 有限要素法による強制振動時の変形解析	74
3.2.3 質量分布型ミキサの作製	78
3.2.4 ドップラー振動計による振幅分布測定	81
3.2.5 蛍光粒子を用いた流れの可視化と混合率測定	83
3.3 結言	89
参考文献	90
第 4 章 タンパク質吸着抑制表面処理	93
4.1 緒言	93

4.2	タンパク質吸着抑制の原理	96
4.2.1	プルロニックの分子構造	96
4.2.2	プルロニックのタンパク質吸着抑制原理	97
4.3	表面処理方法	99
4.3.1	樹脂基板および表面処理剤	99
4.3.2	表面処理手順	101
4.4	タンパク吸着抑制の評価	103
4.4.1	接触角測定	103
4.4.2	指先血を用いた血液吸着評価	105
4.4.3	蛍光標識抗体を用いたタンパク吸着量評価	107
4.5	実験結果および考察	108
4.5.1	接触角測定	108
4.5.2	指先血を用いた血液吸着評価	111
4.5.3	蛍光標識抗体を用いたタンパク吸着量評価	116
4.6	結言	120
	参考文献	121
第5章	マイクロコールドターカウンタ	123
5.1	緒言	128
5.2	マイクロコールドターカウンタの作製方法	128
5.2.1	マイクロ流路成形品	128
5.2.2	電極シート	130
5.3	課題解決の提案	132
5.3.1	試料液量の一定化	132
5.3.2	マイクロ流路への血球付着抑制	134
5.4	実験方法	136
5.4.1	血球のアップーチャ通過観察と電気抵抗測定値の同期計測	136
5.4.2	赤血球計数計測	138
5.5	実験結果および考察	140
5.5.1	コールドター原理の検証	140
5.5.2	赤血球計数 試料液量一定化機構の検証	141
5.6	結言	143

参考文献.....	144
第 6 章 血球計数用集積化デバイス	146
6.1 緒言.....	146
6.2 デバイスおよび装置の作製	150
6.2.1 前処理デバイス	150
6.2.2 送液制御装置	153
6.2.3 計数デバイス	156
6.3 実験.....	157
6.3.1 前処理デバイスの希釈再現性評価	157
6.3.2 前処理デバイスと血球計数デバイスの総合評価	160
6.3.3 血球計数測定再現性不良の原因追求.....	164
6.4 結言.....	169
参考文献.....	170
第 7 章 結言	173
7.1 本論文の結論	173
本論文に関する公表論文.....	177
謝辞	179

第 1 章 緒言

1.1 背景

1990 年頃から、マイクロ流路、マイクロ流体制御デバイス、及びセンサ等を微小なチップ上に集積化して、化学分析における検体採取、反応及び検出といった一連の操作を自動かつ高速に行うことを目的とした μ TAS (Micro Total Analysis Systems) ^[1]に関する研究が盛んに行われている^[2]。 μ TAS は MEMS (Microelectromechanical Systems) 技術^{[3][4]}等の微細加工技術によりデバイスを小型化し、デバイスの小型化に伴うスケール効果を用いて、

- 1) 分析液量の削減
- 2) 反応の迅速化
- 3) 分離の高速化

等を実現できると期待されている。Harrison らは、ウェットエッチングを用いてガラス基板上にマイクロ流路を作製し、そのマイクロ流路内でアミノ酸の電気泳動分析を行い、従来十数分必要であった分析時間を数十秒に短縮することができた^[5]。これが μ TAS の有効性を最初に示したもので、その後、 μ TAS を用いた化学分析に関する研究が数多く発表されている。特に、分析に必要な検査液量を削減するとともに、分子拡散距離を短くすることにより迅速に分析を行えることを利用した研究が多く発表されている^{[6][7]}。

一方、医療分野においては、いわゆる POCT (Point of Care Testing) に対するニーズが高まっている。POCT とは、検査の必要性が生じたその時、患者がいるその場で、あるいは傍らで行う検査であり、速やかに検査結果が得られ、患者自身に検査が見えるという利点がある^{[8]-[10]}。迅速かつ適切な診療、介護、健康管理など医療・福祉の質及び QOL (Quality of life) の向上に資するため、従来の比較的大型の検査システムをコンパクトな POCT デバイスに置き換えようとする研究が盛んに報告されている^{[11]-[17]}。POCT デバイスの取扱者は、検査技師などの手技に熟練した有資格者に限らず、検査手技に不慣れな看護師等が操作することが多いため、取り扱いが簡便であることが重要であ

る。血液検査は、採血、遠心分離や希釈などの前処理、測定、検査結果の報告等の後処理工程から構成されている。この処理に人の介在に加えて多くの処理装置が利用して行われているのが現状である。これらの処理を簡便にするため、採血以降の前処理から検査結果報告までの全ての工程を処理することが可能なシステムが理想である[18]・[21]。この要求を満たすため、すべての工程を集積化し、試料や試薬の消費量を減少させ、検査結果を得るまでの時間、いわゆる **turn around time** を短くすることが可能な μ TAS は、POCT デバイスの有力な候補である。しかしながら、計量、送液、試薬との反応、光学検出などの血液検査においてキーとなる個々の要素を担うデバイスの例は数多く報告されている[22]・[25]ものの、前処理から測定までの工程全体を集積化した POCT 用 μ TAS デバイスは実用化されていない。工程の一部を集積化して実用化された例[26][27]においても、商業的に成功した、いわゆるキラーアイテムとなった例はなく[28][29]、更なる研究が必要とされている。

μ TAS が POCT デバイスとして臨床検査の現場に受け入れられない理由は、コストと性能が両立していないためである[30]・[31]。工業製品として評価され受け入れられるためには、突出した性能はあるが欠点もある、よりはむしろ、信頼性とコストの両立が重要である。POCT デバイスの場合、検査結果によって医師の診断が左右され、ひいては患者の利害にも直結するため、一般工業製品に増して信頼性が重要である。更に、前述のとおり POCT デバイスは、取扱者の手技が低いことが多いことから、取り扱いが簡便であることが必要である。更に、既存装置との競争のため、実用的なコストで作製可能であることも重要である。すなわち、POCT 用 μ TAS デバイスの課題は、

- ① 信頼性（検査結果の再現性）
- ② 簡便性（使い易さ）
- ③ コスト

の3つであるが、これら3つの課題を個別に解決するのではなく、全てを両立することが真の課題である。以下にこれら3つの課題について詳述する。

①信頼性

信頼性とは、検査結果の再現性であり、POCT デバイスのみならず血液検査デバイス全般において最重要視される要素である。従来、POCT デバイスを指向した μ TAS デバイスの多くは、試料液体としてタンパク質を含まない色素水溶液を用いて研究が行われてきた。血液は、脂質、タンパク質など多種多様な物質を含んでおり、粘性、表面張力などにおいて色素水溶液とは異なる^{[32][33]}。特に異なる点は、タンパク質の界面活性作用により、マイクロ流路内において毛管力が発生し自発的な流れが生じることである。このため、マイクロ流路内での送液制御が色素水溶液よりも難しいという課題がある。これは、後に述べるデバイスを集積化する上でも極めて重要な課題である。取り扱う試料が血液の場合、集積化された複数の機能要素間の送液制御を確実に行う必要がある。

また、従来の研究におけるデバイスの性能評価では、繰り返し再現性を評価指標とされることがなく、測定の回数が示されないか、もしくは示される場合にも数回の測定であり、信頼性評価としては不十分であることが多かった。

②簡便性（使い易さ）

一般に手技レベルの低い取扱者を前提とする POCT デバイスにおいて、血液の前処理から測定までの工程を一枚のチップ上に集積化することが望ましい。取扱者は、ただデバイスに血液を滴下することのみを行い、その後の検査工程は全てデバイス内で自動処理されることが理想である。従来、集積化チップの研究が数多く報告されている^{[34]~[36]}。Rossier らは、集積化されたマイクロ流路と電極パターンを用い、血栓症の指標である D-ダイマーを測定している^[37]。また、Honda らは、放射状にマイクロ流路が配置されたディスク状のチップを用い、腫瘍マーカーである α フェトプロテインを測定している^[38]。更に、Zhang ら、及び、Lin らは、マイクロ流路を用いた血球計数デバイスを作製している^{[39][40]}。しかし、これらの研究は、血液の前処理はデバイス外で手技にて行い、測定工程のみをデバイス上で行うというものである。すなわち、血球分離や一定倍率の希釈などの前処理工程がデバイス上

で行われていない。これらの前処理工程を含めて処理することができるデバイスの実現のため、更なる機能の集積化が必要である。

③コスト

POCT 用 μ TAS デバイスは既存の検査装置が存在する分野を対象とするため、既存の装置とのコストの差が重要である。従来、IC などの集積回路を作製するための微細加工技術を利用して μ TAS が作製されていたため、シリコンやガラスなど比較的に高価な無機材料が用いられることが多かった。また、 μ TAS の作製過程における、洗浄、リソグラフィ、エッチング等を含む製造プロセスは、安価なデバイスを作製することが困難であった。そこで、シリコンやガラスの基板上に μ TAS を作製する代わりに、使い捨てデバイスの大量生産に適したプラスチック材料、例えば、ポリジメチルシロキサン^{[41]-[43]}、アクリル樹脂^[44]、ポリカーボネート^[45]、シクロオレフィン系樹脂^{[46][47]}等が基板として用いられている。これらのプラスチック製デバイスは、ソフトリソグラフィ^{[41]-[43]}、機械切削^{[44][46][47]}、シート樹脂材料の貼り合せ^[45]などの製法によって作製されるが、これらの方法は大量生産には適していない。低コストの実現には、大量生産に適した製法を選択も必要である。更に、その製法に適したデバイス構造、すなわち、極力単純なデバイス構造が求められる。以上をまとめると、低コストの実現のためには、安価な材料を用いること、安価に大量生産可能な製法を選択すること、その製法で作製可能な極力単純なデバイス構造、が必要である。

本論文は、国内において年間 9000 万テストと非常に検査数の多い血球計数検査^[48]を対象として、①信頼性（検査結果の再現性）、②簡便性（使い易さ）、③コストの 3 つの課題を同時に解決した POCT デバイスの実現を目的とする。

血球計数検査は、血液を数百～数万倍に希釈し、その希釈された血液を試料として測定する必要があるため、

- (1) 計量機構
- (2) ミキサ
- (3) 計数機構

が必要である。

(1) 計量機構

血液を一定の倍率に希釈するため、微量の血液を一定量採取する計量機構が必要である。正確な量を計量するため、血液の流れを制御する必要がある。

(2) ミキサ

計量された血液と希釈液を混合するために必要である。低コストを実現するための簡易構造と臨床検査に要求される十分な混合性能の両立が必要である。

(3) 計数機構

一定倍率に希釈された血液中の赤血球の数、白血球の数を計数するために必要である。計数の正確性・再現性、及び、製造コストを抑制することが可能なデバイス構造や電極が必要である。

更に、これらの構成要素を集積化することが必要である。

以下では、計量機構等の各構成要素について概説する。

1.1.1 計量機構 マイクロ流路における微量液体の計量

血液検査においては、血液に含まれる物質の濃度を検査結果とすることが多いため、血液検体の計量は検査結果の正確性、精密性に直接影響を与える最も重要な要素である。従来の検査システムは、高性能ポンプを使用することにより、計量の正確性と精密性を確保している。 μ TAS における計量技術として、Unger らはゴムのような弾性を有する PDMS(polydimethylsiloxane)を材料として多層構造のマイクロ流路を作製し、空気圧を加えることでマイクロ流路を開閉するバルブを利用したものが報告している^[49]。図 1-1 に示すように、上側の流路に空気を流し、下側の流路に液体試料を流し、上側の流路の空気圧を高くすると、図 1-1(b)のように、下側の流路が押しつぶされることによって閉じられる。このように、可動部を有するバルブは複雑な構造を必要とするため、製造コストが高くなるという問題がある。そこで、Feng らは図 1-2 に示す、可動部のない疎水性パッシブバルブを提案し

ている[50]。疎水性パッシブバルブとは、疎水性流路の断面積を小さくすると流路抵抗が大きくなり、液体の流入に対する圧力障壁が生じることを利用したものであり、流路内の液体は、バルブの圧力障壁 Y を超える圧力を与えられた場合にのみ前進することができる（図 1-2(b)）。しかし、この研究では、デバイス評価のための試料にタンパク質を含まない水溶液を用いている。疎水性パッシブバルブを用いてタンパク質を含む血液等の生体試料を取り扱うと、マイクロ流路の内壁に血液等が吸着して表面の疎水性を失わせ、毛管力による自発的な流れを生じさせる。このため、疎水性パッシブバルブを用いて計量した試料が所望の送液方向とは逆方向に流れてしまう“逆流現象”が引き起こされ、計量精度を悪化させるという課題がある。疎水性パッシブバルブを利用して正確な血液の計量を行うためには、血液の吸着を抑制する表面処理の研究が必要である。

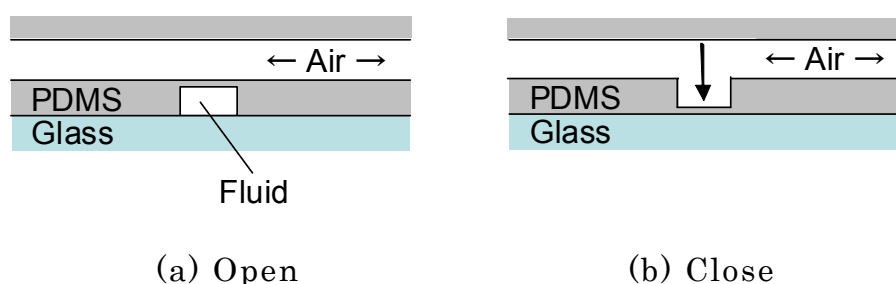


図 1-1 PDMS 製マイクロ流路と空気圧を利用した可動バルブ
Fig.1-1 Schematic of movable valve made of PDMS using air pressure

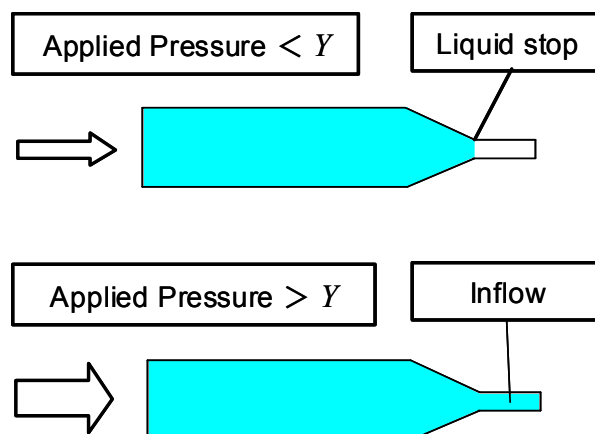


図 1-2 疎水性パッシブバルブ
Fig.1-2 Schematic of Hydrophobic Passive Valve

1.1.2 マイクロ流路における混合

血液検査においては、希釈のために、血液と希釈液との混合が必要である。従来の血液検査システムの場合、血液と希釈液を入れた希釈槽に攪拌棒を挿入し、機械的に混合する。この場合、混合後に攪拌棒の洗浄が必要となり、その結果、システムの大型化・複雑化の要因となっている。本研究が目的とするマイクロ POCT システムにおいては、装置を小型化さらに簡素化することが重要であるため、攪拌棒を使用せず、マイクロデバイス内で血液と希釈液を混合する必要がある。

マイクロ流路においては、流れのレイノルズ数が非常に小さいため、その混合は物質拡散に依存せざるを得ない^[51]。マイクロ流路内の混合を促進するため、様々なマイクロミキサが提案されている。マイクロミキサは、アクティブミキサとパッシブミキサに大別される^[52]。

パッシブミキサは比較的複雑な流路構造によって物質拡散を促進し

たり流路内に渦を発生させるものであり、外部の駆動源を必要としない^{[52][53]}。Wong ら, Bothe ら, Hoffmann らは、T 字型の流路を用いて液と液を合流させることにより混合させたい 2 種類の試料の間の界面の面積を増大させ、物質拡散を促進させるパッシブミキサを提案している^{[54]-[56]}。また、Schonfeld らは、2 種類の試料の合流回数を増やすため、分岐と合流を繰り返す構造の流路を利用したパッシブミキサを報告している^[57]。さらに、Bhagat ら, Wang ら, Chen らは、分岐と合流を繰り返させるために流路内にピラーなどの障害物を設けたパッシブミキサを提案している^{[58]-[60]}。この他にも、T 字型流路と流路内障害物を組み合わせて用いるもの^[61]、流路に溝を設けることによって渦様の流れを誘起させるもの^[62]、流路内に親水性・疎水性のパターンを形成することにより溝と同様の効果を狙ったもの^[63]、など多様なパッシブミキサが報告されている。しかしながら、これらのパッシブミキサの混合性能はアクティブミキサに劣るため、POCT デバイスへ適用するには混合性能が不足している。また、複雑な流路構造を必要とするため、製造コストが高くなる。

一方、アクティブミキサは、外部に駆動源を必要とするが、単純な流路構造で実現可能であるという利点がある^{[52][53][64][65]}。Sheen ら, Jang ら, Yang らは、圧電素子の振動を利用してマイクロ流路内の流れを促進させるアクティブミキサを報告している^{[66]-[69]}が、混合評価に用いる液量が数 nL～数 μ L であり、100 倍程度の希釈を必要とする血球計数デバイスに適用するには少量過ぎるという問題がある。また、混合後のミキシングインデックス^[66]が 0.95 以下であり、ほぼ 1 に相当する均一な混合が必要な POCT デバイスに適用するには混合性能が不足している。Lutz らは、圧電素子よりも大きな振幅が期待できるスピーカーの振動を利用したアクティブミキサを報告している^{[70][71]}が、やはり、混合性能評価に用いる液量は数 μ L 以下である。また、ミキシングインデックスは、0.95 以下である。Sundaram ら, Qian ら, Tai らは、振動に代えて動電的な力を与えるアクティブミキサを報告している^{[72]-[74]}。また、Grumann らは、遠心力を用いるアクティブミキサを報告している^[75]。このように、外部から様々な種類の力を与えるアクティブミキサが報告されているが、いずれのマイクロミキサにおいても、液量が

数 nL～数 μ L 以下少量であること、混合後のミキシングインデックス^[16]が 0.95 以下と混合性能が不足していること、の 2 つの課題がある。さらに、混合の再現性が評価されておらず信頼性に乏しいことも問題である。

POCT デバイスを実現するため、簡易な構造を有し、臨床検査に要求される十分な混合性能を持ったマイクロミキサが必要である。

1.1.3 タンパク質吸着抑制表面処理

血液は、血球と血漿から構成される。血球表面はタンパク質からなり、血漿もアルブミン、 γ -グロブリン、フィブリノーゲン等のタンパク質を含む^[76]。タンパク質は、分子構造中に疎水基を有するため、樹脂材料表面の疎水基と疎水結合によって吸着する^[77]。血球計数検査デバイスの場合、血球が流路へ吸着することによって試料溶液に含まれる血球数が減少して負誤差を生じさせるという課題がある。樹脂材料のマイクロ流路表面へのタンパク質の吸着を抑制する表面処理が必要である。

従来、血液などタンパク質を含む生体試料の吸着を抑制する表面処理剤として、2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) ポリマーが用いられている^[78]。MPC ポリマーは、リン脂質極性基を側鎖にもつメタクリル系ポリマーであり、リン脂質二重層にタンパク質等がモザイク状に組み込まれた生体膜模倣構造を形成することが可能である。マイクロ流体デバイスの表面処理剤^{[79][80]}のみならず、人工透析フィルタ材料^[81]、人工関節材料^[82]への応用が研究されている。このように MPC ポリマーはタンパク吸着抑制に優れた材料であるが、非常に高価である。一方、安価な表面処理剤として、ポリオキシエチレン基を含むポリマー、特にポリエチレングリコール類が知られている^[77]。Lee らは、コロナ放電処理を行ったポリエチレン基板をポリエチレングリコールモノマーの溶液に浸漬した後、80℃の環境に 4 時間置くことによって表面処理を行い、血漿タンパクと血小板の吸着量が減少することを報告している^[83]。また、Farrell らはプラズマ処理によって活性化させた PDMS 基板を用い、ポリエチレングリコールの表面処理を行っている^[84]。一方、Papra らは、コロナ放電やプラズマといったドライ

処理ではなく、塩酸溶液の酸化力を用い、トリメトキシシランポリエチレングリコールの塩酸溶液を用いた PDMS 基板の表面処理を報告している^[85]。また、Yu らは、PDMS 基板に浸透するクロロホルムを溶媒としたポリエチレングリコール／クロロホルム溶液を用い、PDMS 基板への表面処理を行っている^[86]。このように、ポリエチレングリコール類を用いて樹脂基板を表面処理するためには、基板の前処理が必要であったり、酸や有機溶媒が必要であったり、単純な水溶液を用いて簡易に表面処理を行うことができない。そこで、Bi ら、Xiao らは、樹脂表面の疎水基と疎水結合できる疎水基を分子構造に含むポリエチレングリコールを表面処理剤として用い、単純な水溶液を用いてアクリル樹脂基板及び PDMS 基板の表面処理を行っている^{[87][88]}。また、Wu らは、疎水基としてポリプロピレンオキサイド基を含むプルロニック（商品名）を表面処理剤として用い、PDMS 基板への表面処理を行っている^[89]。この他、Shi らは、ポリエーテルスルホンの表面処理剤としてプルロニックを利用し^[90]、Amiji らは、低密度ポリカーボネートへプルロニックを表面処理することによってタンパク質の吸着を抑制できることを報告している^[91]。これらの研究では、種々のプルロニックの中でも親水基の割合の高い分子構造のものが用いられており、タンパク吸着抑制において効果的であると報告されている。しかし、表面処理水溶液に基板を浸漬する時間が 1-24 時間必要であり、製造時間の増加によりコストが高くなる。より短時間に処理の可能な表面処理方法の研究が必要である。

1.1.4 血球計数部 マイクロコールターカウンタ

赤血球の数、白血球の数、血小板の数、及び、ヘモグロビンの濃度等を測定する血球計数検査は、日本国内において年間 9000 万テスト以上実施されている最も一般的な血液検査項目である^[48]。古くは、顕微鏡下で血球数を目視で計数する手法であったが、現在は、コールターカウンタ^[92]法を用いた装置により検査が自動化されている。コールターカウンタでは、図 1-3 に示すように、アパーチャと呼ばれる微細孔を挟んで 2 つの電極が配置され、これらの電極が粒子の分散した電解質溶液試料に浸されている。電極間には、電圧が加えられ、抵抗値が

連続的に測定される。アパーチャを粒子が通過するとき、電解質溶液と粒子の抵抗率の違いから電極間の抵抗値に変化が生じる。コールターカウンタは、この抵抗値変化を電気的パルスとして検出し、このパルスの数を粒子の数として測定数する。このように、粒子 1 個に対して電気的パルス 1 つが対応する原理であるため、粒子が同時に 2 個以上通過する確率の高い高濃度の粒子分散液を試料とする場合、測定精度が低下する。このため、コールターカウンタに用いる粒子分散液は事前に希釈される必要がある。血液の場合、1 マイクロリットル中に約 500 万個の赤血球が含まれ、そのままでは高濃度すぎるため、1 万倍以上の希釈が必要である [76]。

コールターカウンタを用いて粒子の濃度を算出する場合、希釈倍率の情報が必要である。また、アパーチャを通過する試料液の量の情報も必要である。検出された電気的パルスの数とアパーチャ通過液量から測定された粒子分散液の粒子濃度が得られ、さらに希釈倍率から元試料の粒子濃度が算出される。既存の装置においては、希釈倍率を一定にするとともに、試料の流速を一定に保ちながら一定時間の測定を行うことにより、アパーチャ通過液量も一定化している。Roberts ら及び Larsen らは、シリコン基板上に作製したマイクロ流路内にコールターカウンタを組み込んだマイクロコールターカウンタを提案している [93][94]。しかし、これらのマイクロコールターカウンタは、アパーチャ通過液量を一定化する機能を有していない。従来装置の配管よりも流路が細いマイクロコールターカウンタでは、管抵抗が大きいため流速の一定化には精密なポンプが必要である。更に、装置の汚染防止のため、装置と試料液体を触れさせずに、空気を介してデバイス内の試料液体を送液する必要があるため、空気の圧縮性によって流速の一定化が困難である。そこで Lee らは、マイクロコールターカウンタにおいて、流速を一定化せずにアパーチャ通過液量の情報を得るため、2 つのアパーチャを設けたマイクロコールターカウンタを提案している [95]。しかし、2 箇所のアパーチャを設けることによって製造コストが高くなる。このため、より簡易な構造によってアパーチャ通過液量を一定化する手法が必要である。

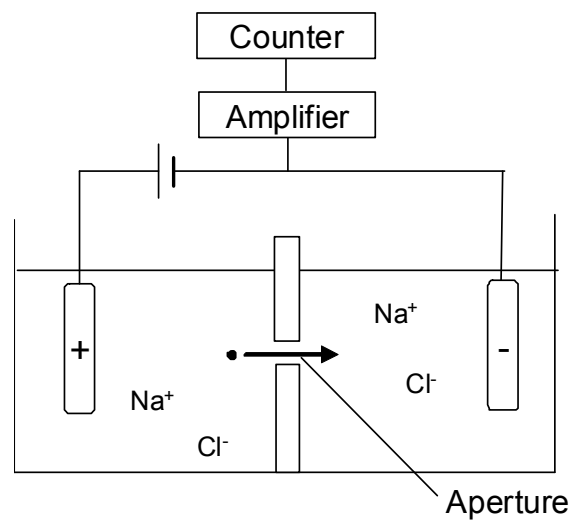


図 1-3 コールターカウンタの原理
Fig.1-3 Schematic of a Coulter counter

1.2 本論文の目的

本論文では、

- ①信頼性（検査結果の再現性）
- ②簡便性（使い易さ）
- ③コスト

の3つの課題を同時に解決した集積化 POCT デバイスとして血球を計数することが可能な μ TAS デバイスを実現するため、1.1.1～1.1.4 に示した課題の解決法を考案し、考案した方法の有効性について考察する。

1.1.1 で示したように、疎水性パッシブバルブを利用して血液を計量する場合、血液がマイクロ流路の内壁に吸着することによって生じる毛管力に起因する“逆流現象”を抑制する必要がある。そこで、本論文では、疎水性かつ血液吸着を抑制可能な表面処理を提案する。そして、その表面処理を施したマイクロ流路を疎水性パッシブバルブとして用い、血液試料を用いた実験により計量の再現性を検証する。また、表面処理が血液吸着を抑制する能力を評価するため、新規な接触角測定方法を提案する。

1.1.2 で示したように、簡易な構造と臨床検査に要求される十分な混合性能を有するマイクロミキサが必要である。本論文では、簡易な構造を用いながら臨床検査で要求される高性能な混合が可能なマイクロミキサを提案する。そして、血液試料を用いた実験により、混合性能を検証する。また、マイクロミキサの混合原理を数値解析によって明らかにし、実験結果との対比からその有効性を考察する。

1.1.3 で示したように、樹脂材料を用いたマイクロ流路への血液吸着を抑制することが必要であり、かつ簡便に短時間に行うことができる低コストな表面処理が必要である。血液吸着を抑制するだけであれば、疎水性パッシブバルブに適用する疎水化表面処理であっても良いが、流路の疎水性の程度が高いと試料を送液する際の管抵抗が大きくなるという問題がある。そこで本論文では、疎水性の程度を上げることなく血液吸着を抑制する表面処理を提案する。そして、血液及び蛍光標識した IgG を用いた吸着評価実験により、表面処理剤の分子構造と吸着抑制性能の関係を考察する。

1.1.4 で示したように、マイクロコールドカウンタにおいては、アパーチャ通過液量を一定化する必要がある。本論文では、流速を一定化する必要の無いアパーチャ通過液量の一定化方法を提案する。そして、マイクロコールドカウンタを作製し、血液を試料とした実験によりその性能を検証する。さらに、作製したマイクロコールドカウンタに血液吸着を抑制する表面処理を施し、その効果を実験によって検証する。

最後に、疎水性パッシブバルブを用いた計量機構及びマイクロミキサを集積化した血液前処理デバイスを作製し、集積デバイス内における送液制御が血液吸着によって乱される機序を明らかにする。そして、この課題に対する解決策として疎水性パッシブバルブに適用したのと同じ疎水化表面処理を用い、血液を用いた実験によりその効果を検証する。

1.3 本論文の構成

本論文は、1.1.1～1.1.4 に示した課題について新たな方法を提案するとともに、提案した方法の有効性について考察する。以下に各章の内容について述べる。

第2章 微量な血液試料の計量 マイクロディスペンサ

1.1.1 で示したように、疎水性パッシブバルブを利用して血液を計量する場合、血液がマイクロ流路の内壁に吸着することによって生じる毛管力に起因する“逆流現象”を抑制する必要がある。そこで、第2章では、疎水性かつ血液吸着を抑制可能な表面処理としてフッ素樹脂コーティングを検討する。量産に適した作製方法である射出成形によってマイクロ流路を作製し、これにフッ素樹脂コーティングを施す。このようにして作製した疎水性パッシブバルブを用い、血液試料を用いた実験により性能を検証する。また、表面処理が血液吸着を抑制する能力を評価するため、同一箇所での二度の静的接触角を測定する方法を提案する。

第3章 マイクロミキサ

1.1.2 で示したように、簡易な構造と臨床検査に要求される十分な混合性能を有するマイクロミキサが必要である。第3章では、射出成形で作製可能な簡易な構造を用いながら臨床検査で要求される高性能な混合が可能な微小磁性ビーズを用いたマイクロミキサ及び振動数を変化させながら加振することに渦を生じさせる原理を用いたマイクロミキサを提案する。そして、血液試料を用いた実験により、混合性能を検証する。また、加振によって渦を生じさせるマイクロミキサにおいては、有限要素解析によって効果的に渦を生じさせることのできる構造を設計し、作製したマイクロミキサを用いた実験の結果と対比することによりその有効性を考察する。

第4章 タンパク質吸着抑制表面処理

1.1.3 で示したように、樹脂材料を用いたマイクロ流路への血液吸着を抑制することが可能であり、且つ簡便に短時間に行うことができる

低コストな表面処理が必要である。血液吸着を抑制するだけであれば、疎水性パッシブバルブに適用する疎水化表面処理であっても良いが、流路の疎水性の程度が高いと試料を送液する際の管抵抗が大きくなるという問題がある。そこで第 4 章では、疎水性の程度を上げることなく血液吸着を抑制でき、かつ短時間に表面処理することのできる安価な表面処理剤として、両親媒性界面活性剤の一種であるプルロニック、特に従来の研究で用いられなかった分子構造のプルロニックを提案する。そして、血液及び蛍光標識した IgG を用いた吸着評価実験により、プルロニックの分子構造とタンパク質吸着抑制性能の関係を考察する。

第 5 章 マイクロコールドターカウンタ

1.1.4 で示したように、マイクロコールドターカウンタにおいては、アパーチャ通過液量を一定化する必要がある。そこで第 5 章では、一定容積の流路の両端に配置された 2 組の電極対を利用した、流速を一定化する必要の無いアパーチャ通過液量の一定化方法を提案する。そして、射出成形で作製したマイクロ流路に印刷で作製した電極シートを貼り合わせてマイクロコールドターカウンタを作製し、血液を試料とした実験によりその性能を検証する。さらに、作製したマイクロコールドターカウンタに第 4 章の血液吸着を抑制する表面処理を施し、その効果を実験によって検証する。

第 6 章 血球計数用集積化デバイス

第 2 章の疎水性パッシブバルブを用いた計量機構、及び第 3 章の微小磁性ビーズを用いたマイクロミキサを集積化し、赤血球計数のための二段階希釈及び白血球計数のための溶血希釈と言う一連の前処理を行うことのできる前処理デバイスを射出成形により作製し、血液を用いた実験により、集積デバイス内における送液制御が血液吸着によって生じる毛管力によって乱される機序を明らかにする。そして、この課題に対する解決策として第 2 章で検討した疎水化表面処理を用い、血液を用いた実験により集積化デバイス内における送液制御に対する効果を検証する。更に、前処理デバイスで希釈した血液を第 5 章のマイクロコールドターカウンタを用いて測定し、その正確性と精密性を市

販の自動血球計数装置と比較評価する。

参考文献

- [1] A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer, Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, *Sensors and Actuators B* 1 (1990) 244-248.
- [2] A. Arora, G. Simone, G. B. Salieb-Beugelaar, J. T. Kim, A. Manz, Latest Developments in Micro Total Analysis Systems, *Analytical Chemistry* 82 (2010) 4830-4847.
- [3] M. Mehregany, K. J. Gabriel, W. S. N. Trimmer, Micro gears and turbines etched form silicon, *Sensors and Actuators* 12 (1987) 341-348.
- [4] L. S. Fan, Y. C. Tai, R. S. Muller, IC-processed electrostatic micromotors, *Sensors and Actuators* 20 (1989) 41-47.
- [5] D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. H. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, Micromachining a miaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip, *Science* 261-5123 (1993) 895-897.
- [6] J. Li, P. Thibault, N. H. Bings, C. D. Skinner, C. Wang, C. Colyer, J. Harrison, Integration of microfabricated devices to capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry using a low dead volume connection: Application to rapid analyses of proteolytic digests, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 3036-3045.
- [7] H. Hisamoto, T. Horiuchi, M. Tokeshi, A. Hibara, T. Kitamori, On-chip integration ofneural ionophore-based ion pair extraction reaction, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 1382-1386.
- [8] S. S. Ehrmeyer, R. H. Laessig, Point-of-care testing: Implementation and practice of cost-effective total quality management, *Accreditation and Quality Assurance* 4 (1999) 419-422.
- [9] P. Yager, G. J. Domingo, J. Gerdes, Point-of-Care Diagnostics for Global Health, *Annual Review of Biomedical Engineering* 10 (2008) 107-144.
- [10] E. Rush, N. Crook, D. Simmons, Point-of-care testing as a tool for screening for diabetes and pre-diabetes, *Diabetes Medicine* 25 (2008) 1070-1075.

- [11] A. J. Tüd, G. A. J. Besselink, R. B. M. Schasfoort, Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry, *Lab on a Chip* 1 (2001) 83-95.
- [12] E. Verpoorte, Microfluidic chips for clinical and forensic analysis, *Electrophoresis* 23 (2002) 677–712.
- [13] T. D. Chung, H. C. Kim, Recent advances in miniaturized microfluidic flow cytometry for clinical use, *Electrophoresis* 28 (2007) 4511–4520.
- [14] D. D. Cunningham, Fluidics and sample handling in clinical chemical analysis, *Analytica Chimica Acta* 429 (2001) 1–18.
- [15] F. B. Myers, L. P. Lee, Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics, *Lab on a Chip* 8 (2008) 2015–2031.
- [16] K. Ohno, K. Tachikawa, A. Manz, Microfluidics: Applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry, *Electrophoresis* 29 (2008) 4443–4453.
- [17] L. Gervais, N. Rooij, E. Delamarche, Microfluidic chips for Point-of-Care immunodiagnostics, *Advanced Materials* 23(24) (2011) H151-H176.
- [18] S. S. Ehrmeyer, R. H. Laessig, Quality in point-of-care testing: what drives the system—personnel, regulatory standards, or instrumentation?, *Accreditation and Quality Assurance* 10 (2004) 47-51.
- [19] C. H. Ahn, J. W. Choi, G. Beaucage, J. H. Nevin, J. B. Lee, A. Puntambekar, J. Y. Lee, Disposable Smart Lab on a Chip for Point-of-Care Clinical Diagnostics, *Proceedings of the IEEE* 92(1) (2004) 154-173.
- [20] J. H. Nichols, Quality in point-of-care testing: taking POC to the next level, *Accreditation and Quality Assurance* 11 (2006) 273-277.
- [21] M. Biehl, T. Velten, Gaps and Challenges of Point-of-Care Technology, *IEEE Sensors Journal* 8(5) (2008) 593-600.
- [22] K. Handique, D. T. Burke, C. H. Mastrangelo, M. A. Burns, Nanoliter liquid metering in microchannels using hydrophobic patterns, *Analytical chemistry* 72 (2000) 4100-4109.

- [23] J. S. Go, S. Shoji, A disposable, dead volume-free and leak-free in-plane PDMS microvalve, *Sensors and Actuators A* 114 (2004) 438–444.
- [24] J. Steigert, M. Grumann, T. Brenner, L. Riegger, J. Harter, R. Zengerle, J. Ducre'xe, Fully integrated whole blood testing by real-time absorption measurement on a centrifugal platform, *Lab on a Chip* 6 (2006) 1040-1044.
- [25] M. Gustafsson, D. Hirschberg, C. Palmberg, H. Jörnvall, T. Bergmann, Integrated sample preparation and MALDI mass spectrometry on a microfluidic compact disk, *Analytical Chemistry* 76(2) (2004) 345 350.
- [26] K. A. Erickson, P. Wilding, Evaluation of a novel Point-of-Care System, the i-STAT analyzer, *Clinical Chemistry* 39/2 (1993) 283-287.
- [27] P. Andersson, G. Jesson, G. Kylberg, G. Ekstrand, G. Thorse'n, Parallel Nanoliter Microfluidic Analysis System, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 4022-4030.
- [28] H. Becker, Chips, money, industry, education and the “killer application”, *Lab on a Chip* 9 (2009) 1659-1660.
- [29] H. Becker, Hype, hope and hubris: the quest for the killer application in microfluidics, *Lab on a Chip* 9 (2009) 2119-2122.
- [30] C. Haber, Microfluidics in commercial applications; an industry perspective, *Lab on a Chip* 6 (2006) 1118-1121.
- [31] H. Becker, It's the economy, *Lab on a Chip* 9 (2009) 2759-2762.
- [32] R. Hoffman, E. J. Benz Jr., S. J. Shattil, B. Furie, H. J. Cohen, L. E. Silberstein, P. MoGlave, *Hematology: Basic Principles and Practice*, fourth ed., Churchill Livingstone, 2004.
- [33] L. Coppola, F. Caserta, D. D. Lucia, S. Guastafierro, A. Grassia, A. Coppola, R. Marfella, M. Varricchio, Blood viscosity and aging, *Archives of Gerontology and Geriatrics* 31 (2000) 35–42
- [34] D. Erickson, D. Li, Integrated microfluidic devices, *Analytica Chimica Acta* 507 (2004) 11-26.
- [35] S. Haeberle, R. Zengerle, Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications, *Lab on a Chip* 7 (2007) 1094-1110.

- [36] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. Stettenz, R. Zengerle, Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications, *Chemical Society reviews* 39 (2010) 1153-1182.
- [37] J. S. Rossier, H. H. Girault, Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection, *Lab on a Chip* 1 (2001) 153-157.
- [38] N. Honda, U. Lindberg, P. Andersson, S. Hoffmann, H. Takei, Simultaneous Multiple Immunoassays in a Compact Disc-Shaped Microfluidic Device Based on Centrifugal Force, *Clinical Chemistry* 51:10 (2005) 1955-1961.
- [39] H. Zhang, C. H. Chon, X. Pan, D. Li, Methods for counting particles in microfluidic applications, *Microfluid Nanofluid* 7 (2009) 739-749.
- [40] Y. H. Lin, G. B. Lee, An integrated cell counting and continuous cell lysis device using an optically induced electric field, *Sensors and Actuators B* 145 (2010) 854-860.
- [41] C. C. Lin, C. C. Tseng, C. J. Huang, J. H. Wang, G. W. Lee, An integrated microfluidic chip for non-immunological determination of urinary albumin, *Biomedical Microdevices* 12 (2010) 887-896.
- [42] W. B. Lee, Y. H. Chen, H. I. Lin, S. C. Shiesh, G. B. Lee, An integrated microfluidic system for fast, automatic detection of C-reactive protein, *Sensors and Actuators B* 157 (2011) 710-721.
- [43] B. Ma, G. Zhang, J. Qin, B. Lin, Characterization of drug metabolites and cytotoxicity assay simultaneously using an integrated microfluidic device, *Lab on a Chip* 9 (2009) 232-238.
- [44] R. D. Johnson, I. H. A. Badr, G. Barrett, S. Lai, Y. Lu, M. J. Madou, L. G. Bachas, Development of a fully integrated analysis system for ions based on ion-selective optodes and centrifugal microfluidics, *Analytical Chemistry* 73 3940-3946.
- [45] Y. Wang, Q. He, Y. Dong, H. Chen, In-channel modification of biosensor electrodes integrated on a polycarbonate microfluidic chip for micro flow-injection amperometric determination of glucose, *Sensors and Actuators B* 145 (2010) 553-560.

- [46] M. Mahalanabis, J. Do, H. ALMuayad, J. Y. Zhang, C. M. Klapperich, An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification, *Biomedical Microdevices* 12 (2010) 353-359.
- [47] A. F. S. Budge, P. Mirer, A. Chatterjee, C. M. Klapperich, D. Chargin, A. Sharon, Low cost and manufacturable complete microTAS for detecting bacteria, *Lab on a Chip* 9 (2009) 2803-2810.
- [48] 厚生労働省, 社会医療診療行為別調査 (2008)
- [49] M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S. R. Quake, Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography, *Science* 288(113) (2000) 113-116.
- [50] Y. Feng, Z. Zhou, X. Ye, J. Xiong, Passive valves based on hydrophobic microfluidics, *Sensors and actuators. A, Physical* 108 (2003) 138-143.
- [51] A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone, G. M. Whitesides, Chaotic mixer for microchannels, *Science* 295 (2002) 647-651.
- [52] V. Hessel, H. Lowe, F. Schonfeld, Micromixers - a review on passive and active mixing principles, *Chemical Engineering Science* 60 (2005) 2479-2501.
- [53] N. T. Nguyen, Z. Wu, Micromixers- a review, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 15 (2005) R1-R16.
- [54] S. H. Wong, M. C. L. Ward, C. W. Wharton, Micor T-mixer as a rapid mixing micromixer, *Sensors and Actuators B Chemical* 100 (2004) 359-379.
- [55] D. Bothe, C. Stemich, H. J. Warnecke, Fluid mixing in a T-shaped micro-mixer, *Chemical Engineering Science* 61 (2006) 2950-2958.
- [56] M. Hoffmann, M. Schluter, N. Rabiger, Experimental investigation of liquid-liquid mixing in T-shaped micro-mixers using μ -LIF and μ -PIV, *Chemical Engineering Science* 61 (2006) 2968-2976.
- [57] F. Schonfeld, V. Hessel, C. Hofmann, An optimised split-and-recombine mixer with uniform chaotic mixing, *Lab on a Chip* 4 (2004) 65-69.

- [58] A. A. S. Bhagat, E. T. K. Peterson, I. Papautsky, A passive planar micromixer with obstructions for mixing at low Reynolds numbers, *Journal of micromechanics and microengineering* 17 (2007) 1017-1024.
- [59] H. Wang, P. Iovenitti, E. Harvey, S. Masood, Optimizing layout of obstacles for enhanced mixing in microchannels, *Smart materials & structures* 11 (2002) 662-667.
- [60] L. Chen, G. Wang, C. Lim, G. H. Seong, J. Choo, E. K. Lee, S. H. Kang, J. M. Song, Evaluation of passive mixing behaviors in a pillar obstruction poly(dimethylsiloxane) microfluidic mixer using fluorescence microscopy, *Microfluid Nanofluid* 7 (2009) 267-273.
- [61] Y. C. Lin, Y. C. Chung, C. Y. Wu, Mixing enhancement of the passive microfluidic mixer with J-shaped baffles in the tee channel, *Biomedical Microdevices* 9 (2007) 215-221.
- [62] P. B. Howell, Jr., D. R. Mott, S. Fertig, C. R. Kaplan, J. P. Golden, E. S. Oran, F. S. Ligler, A microfluidic mixer with grooves placed on the top and bottom of the channel, *Lab on a Chip* 5 (2005) 524-530.
- [63] J. F. Wang, Y. Liu, Y. S. Xu, The golden-mean surface pattern to enhance flow mixing in micro-channel, *Bio medical Microdevices* 11 (2009) 351-357.
- [64] S. Jayaraj, S. Kang, Y. K. Suh, A review on the analysis and experiment of fluid flow and mixing in micro-channels, *Journal of Mechanical Science and Technology* 21(2007) 536-48.
- [65] H. A. Stone, A. D. Strook, A. Ajdari, Engineering flows in small devices: Microfluidics toward a Lab-on-a-Chip, *Annual review of fluid mechanics* 36 (2004) 381-411.
- [66] H. J. Sheen, C. J. Hsu, T. H. Wu, H. C. Chu, C. C. Chang, U. Lei, Experimental study of flow characteristics and mixing performance in a PZT self-pumping micromixer, *Sensors and Actuators A Physical* 139 (2007) 237-244.
- [67] L. S. Jang, S. H. Chao, M. R. Holl, D. R. Meldrum, Microfluidic circulatory flows induced by resonant vibration of diaphragms, *Sensors and Actuators A Physical* 122 (2005) 141-148.

- [68] Z. Yang, M. Matsumoto, H. Goto, M. Matsumoto, R. Maeda, Ultrasonic micromixer for microfluidic systems, *Sensors and Actuators A Physical* 93 (2001) 266-272.
- [69] Z. Yang, H. Goto, M. Matsumoto, R. Maeda, Active micromixer for microfluidic systems using lead-zirconate-titanate(PZT)-generated ultrasonic vibration, *Electrophoresis* 21 (2000) 116-119.
- [70] B. R. Lutz, J. Chen, D. T. Schwartz, Microfluidics without microfabrication, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(8) (2003) 4395-4398.
- [71] S. Oberti, A. Neild, T. W. Ng, Microfluidic mixing under low frequency vibration, *Lab on a Chip* 9 (2009) 1435-1438.
- [72] N. Sundaram, D. K. Tafti, Evaluation of microchamber geometries and surface conditions for electrokinetic driven mixing, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3785-3793.
- [73] M. Yi, S. Qian, H. H. Bau, A magnetohydrodynamic chaotic stirrer, *Journal of fluid mechanics* 468 (2002) 153-177.
- [74] C. H. Tai, R. J. Yang, M. Z. Huang, C. W. Liu, C. H. Tsal, L. M. Fu, Micromixer utilizing electrokinetic instability-induced shedding effect, *Electrophoresis* 27 (2006) 4982-4990.
- [75] M. Grumann, A. Geipel, L. Riegger, R. Zengerle, J. Ducree, Batch-mode mixing on centrifugal microfluidic platforms, *Lab on a Chip* 5 (2005) 560-565.
- [76] R. Hoffman, E. J. Benz Jr., S. J. Shattil, B. Furie, H. J. Cohen, L. E. Silberstein, P. MoGlave, *Hematology: Basic Principles and Practice*, fourth ed., Churchill Livingstone, 2004.
- [77] 岩田博夫, バイオマテリアル, 共立出版 (2005)
- [78] Ishihara K, Ziats NP, Nakabayashi N, Anderson JM, Protein adsorption from human plasma is reduced on phospholipid polymers, *Journal of biomedical materials research* 25 (1991) 1397-1407.

- [79] J. Sibarani, M. Takai, K. Ishihara, Surface modification on microfluidic devices with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers for reducing unfavorable protein adsorption, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 54 (2007) 88-93.
- [80] T. Goda, T. Konno, M. Takai, T. Moro, K. Ishihara, Biomimetic phosphorylcholine polymer grafting from polydimethylsiloxane surface using photo-induced polymerization, *Biomaterials* 27 (2006) 5151-5160.
- [81] S. H. Ye, J. Watanabe, Y. Iwasaki, K. Ishihara, Novel cellulose acetate membrane blended with phospholipid polymer for hemocompatible filtration system, *Journal of Membrane Science* 210 (2002) 411-421.
- [82] M. Kyomoto, T. Moro, K. Saiga, F. Miyaji, H. Kawaguchi, Y. Takatori, K. Nakamura, K. Ishihara, Lubricity and stability of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) polymer layer on Co-Cr-Mo surface for hemi-arthroplasty to prevent degeneration of articular cartilage, *Biomaterials* 31 (2010) 658-668.
- [83] J. H. Lee, B. J. Jeong, H. B. Lee, Plasma protein adsorption and platelet adhesion onto comb-like PEO gradient surfaces, *Journal of biomedical materials research* 34 (1997) 105-114.
- [84] M. Farrell, S. Beaudoin, Surface forces and protein adsorption on dextran-and polyethylene glycol-modified polydimethylsiloxane, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81 (2010) 468-475.
- [85] A. Papra, A. Bernard, D. Juncker, N. B. Larsen, B. Michel, E. Delamarche, Microfluidic networks made of PDMS, Si, and Au coated with PEG for patterning proteins onto surfaces, *Langmuir* 17 (2001) 4090-4095.
- [86] K. Yu, Y. Han, A stable PEO-tethered PDMS surface having controllable wetting property by a swelling-deswelling process, *Soft Matter* 2 (2006) 705-709.
- [87] H. Bi, S. Meng, Y. Li, K. Guo, Y. Chen, J. Kong, P. Yang, W. Zhong, B. Liu, Deposition of PEG onto PMMA microchannel surface to minimize nonspecific adsorption, *Lab on a Chip* 6 (2006) 769-775.

- [88] Y. Xiao, X. D. Yu, J. J. Xu, H. Y. Chen, Bulk modification of PDMS microchips by an amphiphilic copolymer, *Electrophoresis* 28 (2007) 3302-3307.
- [89] Z. Wu, Klas Hjort, Surface modification of PDMS by gradient-induced migration of embedded Pluronic, *Lab on a chip* 9 (2009) 1500–1503.
- [90] Q. Shi, S. Ye, C. Kristalyn, Y. Su, Z. Jiang, Z. Chen, Probing molecular-level surface structures of polyethersulfone/Pluronic F127 blends using sum-frequency generation vibrational spectroscopy, *Langmuir* 24 (2008) 7939-7946.
- [91] M. Amiji, K. Park, Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers, *Biomaterials* 13(10) (1992) 682-692.
- [92] W. H. Coulter, Means for counting particles suspended in a fluid, U.S. Patent 2,656,508, filed 1949 and issued 1953.
- [93] K. Roberts, M. Parameswaran, M. Moore, R. S. Muller, A silicone microfabricated aperture for counting cells using the aperture impedance technique, *Proceedings of the 1999 Institute of Electrical and Electronics Engineers Canadian Conference* (1999)
- [94] U. D. Larsen, G. Blankenstein, J. Branebjerg, Microchip particle counter, *International Conference on Solid-State Sensors and Actuators (TRANSDUCERS '97)* (1997) 1319-1322.
- [95] D. W. Lee, S. Yi, Y. H. Cho, A Flow Rate Independent Cell concentration measurement chip using electrical cell counters across a fixed control volume, *Journal of Microelectromechanical Systems* 17(1) (2008) 139-146.

第 2 章 微量な血液試料の計量

マイクロディスペンサ

2.1 緒言

本論文で対象とする血球計数検査においては、血液がアパーチャ(微小管)を通過するのを電氣的に検出し、検出の回数を以って血球数を数えるという測定原理を用いる。この測定原理では、2 つ以上の血球が同時にアパーチャを通過しても 1 つの血球として検出されてしまうため、血球の濃度が高すぎると、計数の正確性および精密性が劣化する。このような、2 つ以上の血球の同時通過による計数精度等の劣化を防止するため、血球計数の前処理として、血液を浸透圧による血球破壊の生じない生理的食塩水等張の希釈液を用いて数百から数万倍に希釈することが行われる。POCT デバイス上で血液の希釈を行うためには、血液を定量的に取り出し・吐出するマイクロディスペンサと血液と希釈液を混合するためのミキサが必要である。POCT デバイスのサイズを小さくするには希釈液の量を小さくしなければならないが、例えば数十 μl の希釈液で数十倍から数百倍の希釈を行うためには、数百 nl ～数 μl の血液を定量的に精度よく取り出し・吐出する構造をマイクロ流路内に作製する必要がある。血球計数検査の測定精度は、変動係数で 3% 以下を求められるため、POCT デバイスに用いるマイクロディスペンサには、少なくとも変動係数で 3% 以下の精度が必要である。

Swierkowski らは、インクジェットの原理を用いたマイクロディスペンサ^[1]を、また、Samel ら、Hansen らは、PDMS (polydimethylsiloxane) 製の流路を空気圧によって潰すことにより開閉するバルブを使用するマイクロディスペンサ^{[2][3]}を提案している。これらのマイクロディスペンサは、物理的に一定量の試料を切り取る機構を持つため再現性に優れると考えられるが、いずれも流路中に可動部を必要とし、そのために製造コストが高くなるという問題があった。そこで、Puntambekar ら、Yamada ら、Park らは、可動部を必要とせず平面的な流路だけで構成可能な疎水性パッシブバルブを用いたマイクロディ

スペンサを報告している[4]・[6]。疎水性パッシブバルブとは、疎水性流路の断面積を小さくすると流路抵抗が大きくなり、液体の流入に対する圧力障壁が生じることを利用したものである[5]。矩形断面を有する流路の圧力障壁 Y は、以下のヤング・ラプラス式で与えられる。

$$Y = -2 \gamma \cos \theta (1/w + 1/h) \quad (1)$$

ここで、 w は流路巾、 h は流路深さであり、 γ は液体の表面張力、 θ は接触角をそれぞれ表す。圧力障壁 Y は流路の巾や深さが小さくなるにつれて、また接触角 θ が増加するにつれて増大する。流路内の液体は、圧力障壁 Y を超える圧力を与えられた場合にのみ前進することができる。

疎水性パッシブバルブの構造概念図を図 2-1 に示す。図 2-1 の流路は、それぞれ異なる断面積を有する 2 つの流路から構成されている。図 2-1(a) に示すように、断面積の大きな流路内の液体に小さな流路の方向へ圧力障壁 Y よりも小さな圧力が加えられるとき、液体は断面積の小さな流路の直前で停止する。その後、圧力障壁 Y を越える圧力が与えられると、液体は断面積の小さな流路へ流入する。このように、疎水性かつ断面積の小さな流路は液体に加えられる圧力に応じてバルブとして働く。

次に、疎水性パッシブバルブを用いたマイクロディスペンサの構造概念図を図 2-2 に示す。図 2-2(a) に示すように、幹流路と直交する一定容積の計量流路の先端に狭窄部を作製し、その後に混合チャンバ部分を作製する。この流路内全体を疎水性にすることで、先端の狭窄部が疎水性パッシブバルブとして働く。図 2-2(b) に示すように、圧力障壁 Y よりも小さな圧力で液体を流路に流入させると、計量流路の先端で液体が停止する。この後、図 2-2(c) に示すように圧力障壁 Y よりも小さな圧力で幹流路に空気を流入させると、計量流路内の液体は狭窄部で停止したままであるが、幹流路内の液体は流れていくことができるため、計量流路内の液体を幹流路内の液体と分離することができる(図 2-2(d))。次に、図 2-2(e) に示すように、幹流路の一方から空気を流入させ、もう一方を閉じることによって流路内の圧力を上げると、

液体に加わる圧力が疎水性パッシブバルブの圧力障壁を超えたとき、計量流路内の液体を混合チャンバに吐出することができる。

疎水性パッシブバルブは可動部を持たず、平面的な流路だけで構成されるため、射出成形によって作製することが可能であり低コストに生産可能である。このため、実用的なコストで生産できることが必要な POCT デバイスに適したバルブと言える。しかしながら、従来の研究では、評価に色素水溶液を用いており、血液等の生体試料を用いた評価がなされていないという問題があった。血液にはタンパク質が含まれており、図 2-2(e)のように狭窄流路を血液が通過する時、流路内壁にタンパク質が吸着^{[7]・[9]}し、流路内壁の疎水性が失われ親水性となる^[8]。狭窄部が親水性となると、毛管力が生成するため、図 2-2(f)に示すように混合チャンバ内の液体が計量流路に逆流する。この逆流によって、混合チャンバ内に供給する液体試料の量の変動するという問題を生じる。疎水性パッシブバルブを用いるマイクロディスペンサで血液を計量吐出するため、逆流を生じさせない対策が必要である。

本研究では、この疎水壁面と狭窄部から構成するマイクロディスペンサを設計し、評価を行った。

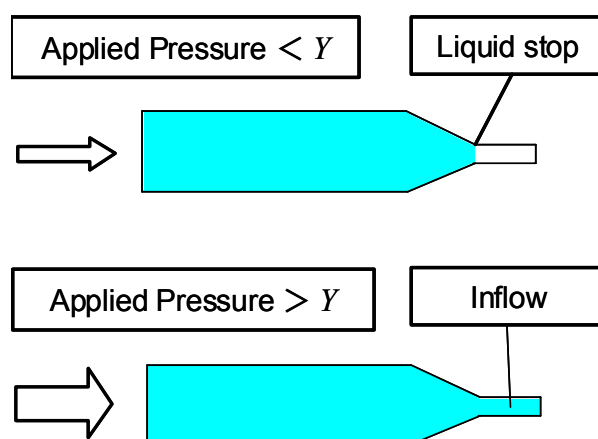


図 2-1 疎水性パッシブバルブの構造概念図

Fig.2-1 Schematic of a hydrophobic passive valve

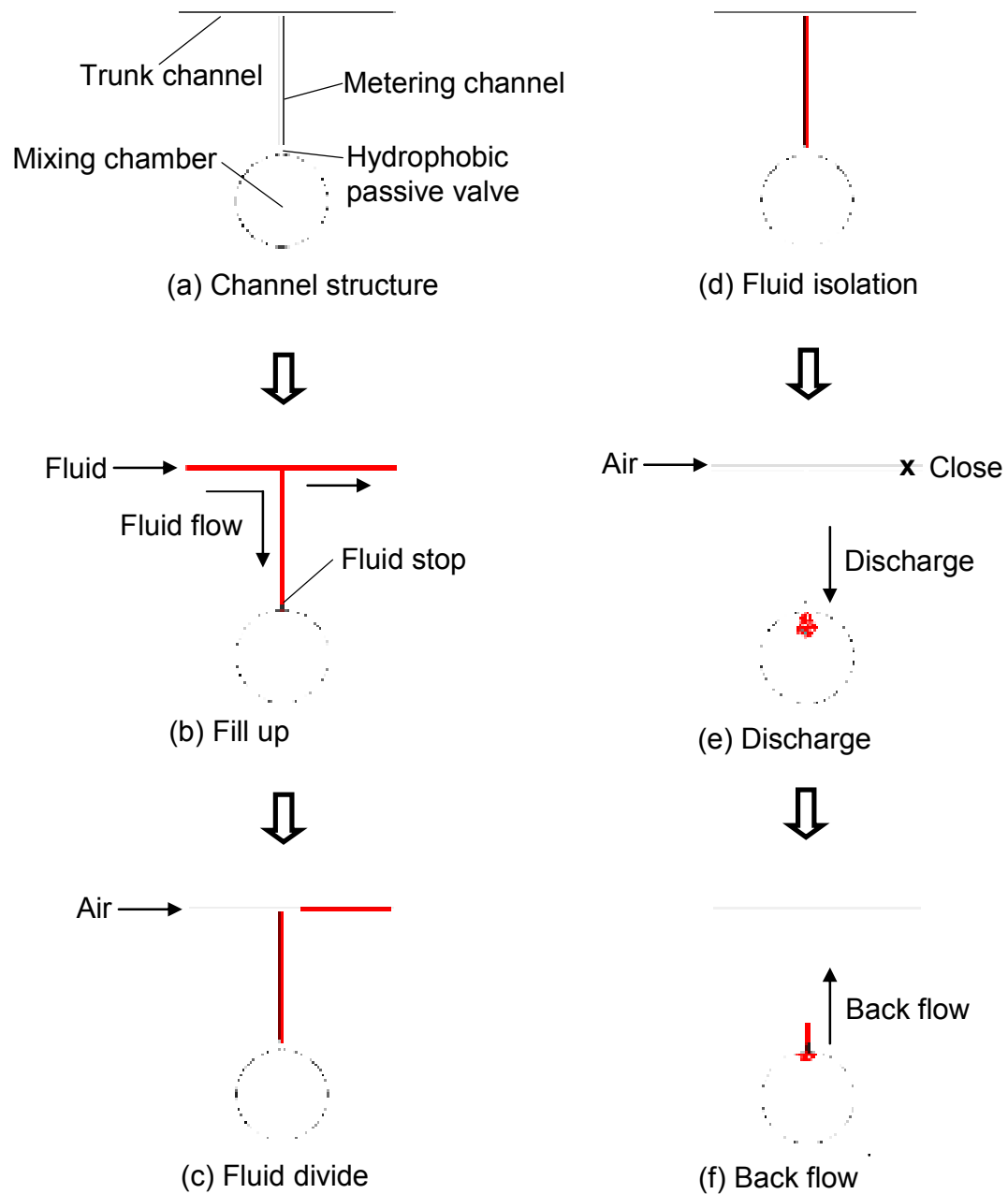


図 2-2 疎水性パッシブバルブを利用したマイクロディスペンサ
Fig.2-2 A microdispenser utilizing a hydrophobic passive valve

2.2 マイクロディスペンサの構造と設計

図 2-3 に作製したマイクロディスペンサの構造を示す。マイクロディスペンサは、血液試料を定量希釈するため、計量流路と混合チャンバから構成した。計量流路の先端には狭窄部を設け、疎水性パッシブバルブとして利用した。計量流路を 4 本作製したのは、それぞれの狭窄部の寸法を変化させ、狭窄部の寸法が計量精度に与える影響を評価するためである。

計量流路および狭窄部の寸法は、流路内の疎水性表面特性により決定しなければならない。また、吐出の際に必要な圧力（以下、吐出圧力）が高いとデバイスのフタの耐圧を高くしなければならず、圧力を加えるために要する時間が長くなり、その結果、測定時間が長くなるという問題が生じるため、設計の段階で吐出圧力を計算する必要がある。そこで、吐出圧力を以下のように求めた。

図 2-4 に示すように、本論文のマイクロディスペンサでは、狭窄部を液体が通過するとき、乾いた流路内壁を液体が濡らしながら前進する。このため、狭窄部の圧力障壁を計算するために静的接触角を用いる代わりに、乾いた基板を液滴が濡らしながら拡張する際の接触角である拡張前進角を用いることとした。

また、図 2-5 に示すように、計量流路内の液体を吐出するとき、計量流路の後方端部では空気によって計量流路内の液体が押し出される。このとき、液体を流路内壁から引き剥がす力が必要であり、吐出圧力を計算するには、この力を狭窄部で発生する圧力障壁に加算する必要があると考える。この液体を流路内壁から引き剥がす力は、液滴を載せた基板を徐々に傾け、重力によって液滴が移動し始めるときの基板の傾斜角である滑落角から求める^{[10]・[11]}こととする。滑落角における液滴の模式図を図 2-6 に示す。滑落角において液滴に働く重力は、液滴で濡れた基板から液滴を引き剥がすように作用する力であり、本論文のマイクロディスペンサの吐出時において計量流路内壁から液体を引き剥がす力と同様であると考えられる。

以上の考察から吐出圧力 D は、下式(2)で表すことができる。

$$D = -2 \gamma \cos \theta_e (1/w + 1/h) + N_c/S_c \quad (2)$$

ここで、 γ は液体の表面張力であり、 w は狭窄部の流路巾、 h は狭窄部の流路深さ、 θ_e は拡張前進角、 N_c は計量流路内壁から試料を引き剥がすのに必要な力、 S_c は計量流路の断面積をそれぞれ表す。吐出圧力 D は式(1)の疎水性パッシブバルブの圧力障壁 Y と比較して、静的接触角が拡張前進角に代わっていること、 N_c/S_c の項が付加されている点で異なる。

本研究では、逆流を生じさせないための疎水化表面処理の選択、吐出圧力を計算して狭窄部および計量流路の寸法を設計するため、

①静的接触角

②拡張前進角

③滑落角

の3種類の評価を行った。

マイクロ流路の基板としては、射出成形が可能な安価な樹脂であり、透明性と溶剤耐性を有するポリスチレンを用い、疎水性の表面処理として、フッ素樹脂とポリジメチルシロキサンを処理剤として用いた。フッ素樹脂としては、フロテクノジー社 **FS-2010** (アクリル樹脂)を用い、ポリジメチルシロキサンとしては、ナカライテスク社の **SH-200**を用いた。いずれの表面処理剤の場合も、ポリスチレン基板を蒸留水およびエタノールを用いて超音波洗浄し、ドラフトチャンバー内で室温環境で1日以上乾燥した後、フッ素樹脂とポリジメチルシロキサンをそれぞれ n -ヘプタン溶液を用いて濃度 1%に調製し、ポリスチレン (**HH-102, Japan PolyStyrene**) 製基板にスプレー塗布した。その後、ドラフトチャンバー内で室温環境下で 24 時間乾燥させた。

①静的接触角の測定方法

血液には多くのタンパク質が含まれていることから、疎水性の評価においては、接触角を表面処理した直後の表面において行うだけではなく、血液が1度基板表面に接触し、基板表面に血液中のタンパク質が非特異的に吸着した後の接触角を測定することが必要である。これは、前述したように、マイクロディスペンサを用いて血液の定量吐出を行うためには、狭窄部で血液が1度流路を通過した後、疎水性を保ち吐出した血液の逆流を防止することが必要であることによる。

基板表面と 2 種類のコーティング表面の静的接触角は、協和界面科学製接触角計 CA-X を用いて測定した。測定装置の略図を図 2-7 に示す。測定装置は、基板上に一定量の液滴を滴下するためのノズルと、滴下した液滴の接触角を液滴の側面から観察するカメラを備えており、基板上の液滴の端部が基板に対してなす角を撮影画像から測定することができる。粉末状の抗凝固剤 EDTA-2K が予め入れられた市販の真空採血管（テルモ製）を用いて静脈から採血し遠心分離して血液から血漿を取り接触角の評価液として用いた。比較のために蒸留水、及び、血漿を蒸留水を用いて 5% に希釈した水溶液、の 3 種類を用いた。蒸留水にはタンパク質は含まれておらず、5% 血漿水溶液と血漿は含有するタンパク質の量が 20 倍異なる。

静的接触角は以下の手順で測定した。図 2-8 に各測定ステップにおける液滴の写真を示す。

- 1) 静電気によって液滴形状が変化するのを防止するため、空気イオナイザー(WINSTAT BF-ZC, シシド静電気社)を用いて基板を除電
- 2) 表面処理したポリスチレン基板上にそれぞれの液をノズルを用いて 2 μ L 滴下 (図 2-8(a))
- 3) 1 回目の静的接触角を測定
- 4) ノズルを基板に近づけ、液滴を全量吸引し取り去る (図 2-8(b))
- 5) ノズルを用いて 1 回目の液滴と同じ位置に 2 μ L 滴下 (ノズル内は試料液体で満たされているため、1 回目の測定と全く同じ試料液体ではないが、成分は同一である)
- 6) 2 回目の静的接触角を測定(図 2-8(c))

これらの一連の測定は、15 枚の基板を用いて行った。

② 拡張前進角の測定方法

動的接触角の一種である拡張前進角は、協和界面科学製の動的接触角計 DM-500 を用い、拡張接触角測定法^[11]により測定した。測定装置の略図を図 2-9 に示す。この装置は、ノズルを用いて一定速度で液を基板上に吐き出すためのノズルと液滴の側面から観察するカメラを備えており、ノズルから一定速度で液体を吐出して液滴を拡張させなが

ら、0.5 秒ごとに接触角を測定することができる。ポリジメチルシロキサン処理した基板に蒸留水を滴下して 拡張前進角を測定中の液滴写真を図 2-10 に示す。1 μ L の液滴を基板にノズルを用いて接触させた初期状態の液滴が図 2-10 の(a)であり、内径 0.4mm のノズルから 6 μ l/sec で液体を供給して液滴を拡張している途中の状態の液滴が(b)であり、(c)は 拡張後の液滴である。滴下した初期の液滴を拡張させながら 9.5 秒後まで 0.5 秒ごとに拡張前進角を測定した。

③ 滑落角の測定方法

吐出の際、定量流路壁面から液体試料が剥がすのに必要な力を計算するため、動的接触角の一つである滑落角を協和界面科学製の動的接触角計 DM-500 を用いて測定した。滑落角とは、液滴を載せた基板を徐々に傾け、重力によって液滴が移動し始めるときの基板の傾斜角である^{[10][11]}。測定装置の略図を図 2-11 に示す。この装置は、一定量の液滴を基板に滴下するためのノズルと滴下した液滴の接触角を液滴の側面から観察するカメラを備えており、ノズルを用いて液滴を滴下した後、一定速度で基板を傾けながら、傾斜角 1° 毎に液滴の画像を撮影することができ、液滴の画像を用いて液滴が重力で下方に動いたときの基板の傾斜角を測定することができる。フッ素樹脂処理をした基板と 5%血漿水溶液を用いて滑落角を測定した時の液滴の写真を図 2-12 に示す。(a)が初期状態、すなわち基板が水平の状態であり、(b)が基板を 38° 傾けた状態の液滴の写真である。

基板に 40 μ L の液滴を内径 0.4mm のノズルを用いて滴下し、0~90° まで 1° 毎に傾斜角を変化させて、液滴の様子を撮影し、液滴が移動し始める直前の傾斜角を滑落角とした。

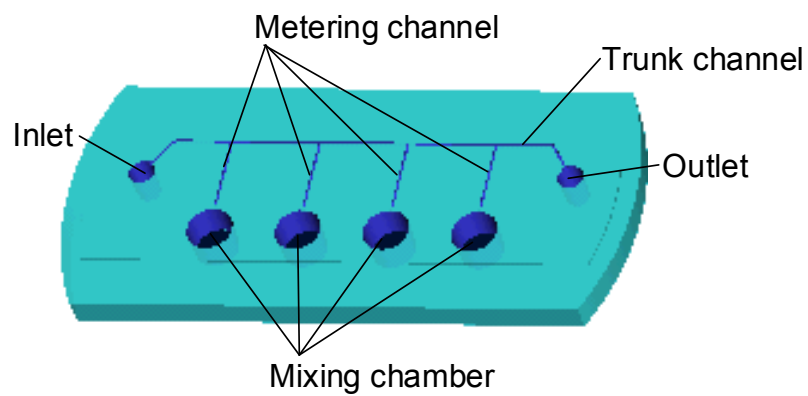


図 2-3 マイクロディスペンサの構造
Fig.2-3 Structure of microdispenser

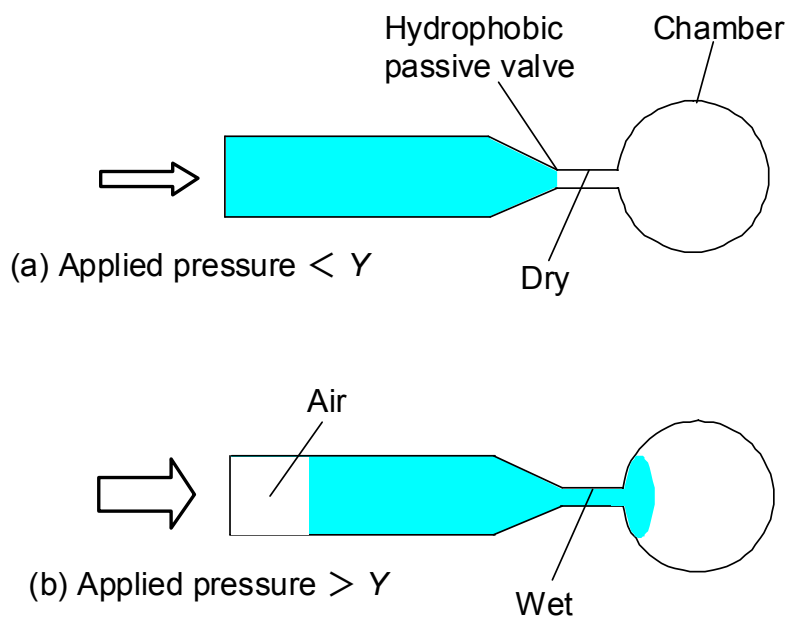


図 2-4 吐出時の流路内液体挙動
Fig.2-4 Fluid flow in the metering channel at discharge

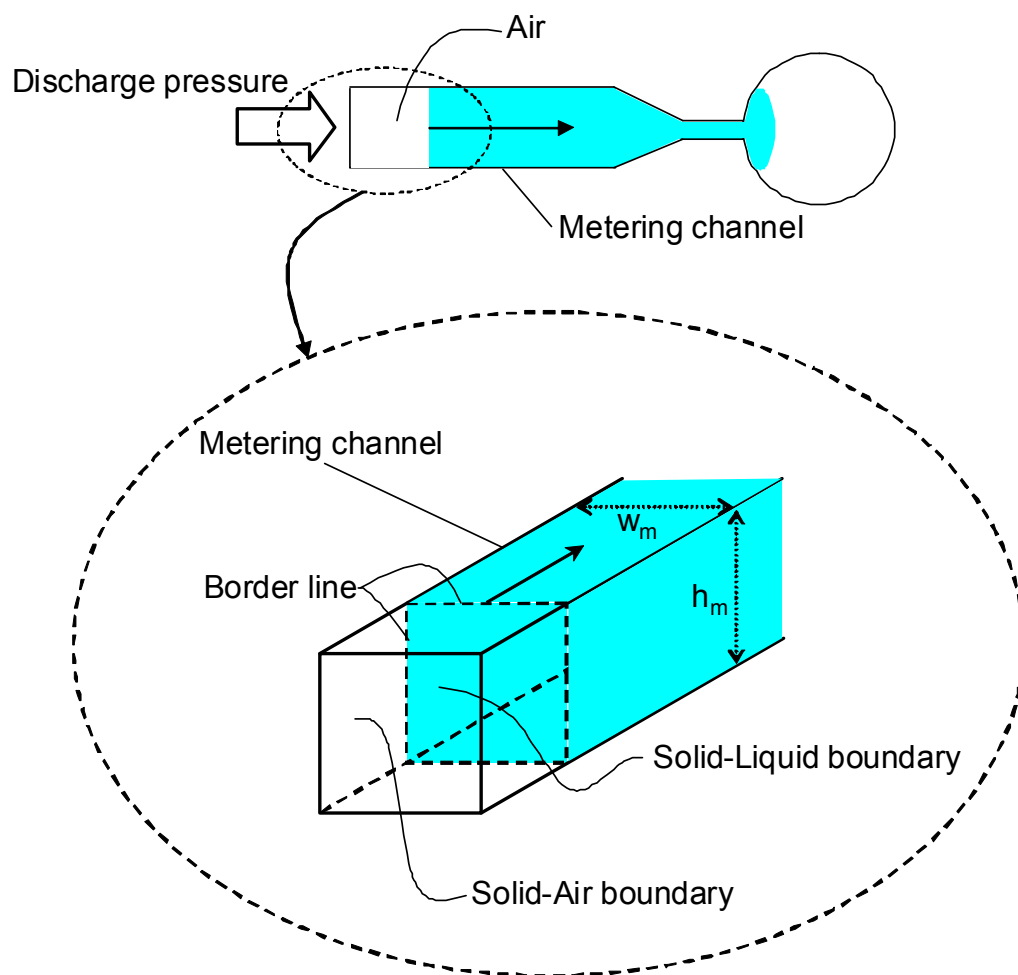


図 2-5 吐出時の計量流路後方部の拡大図

Fig.2-5 Enlarged view of rear cross-section of metering channel

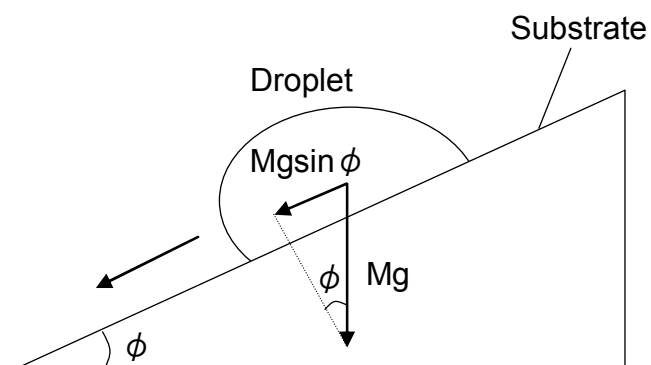


図 2-6 滑落角における液滴の模式図
Fig.2-6 Schematic of a droplet at sliding angle

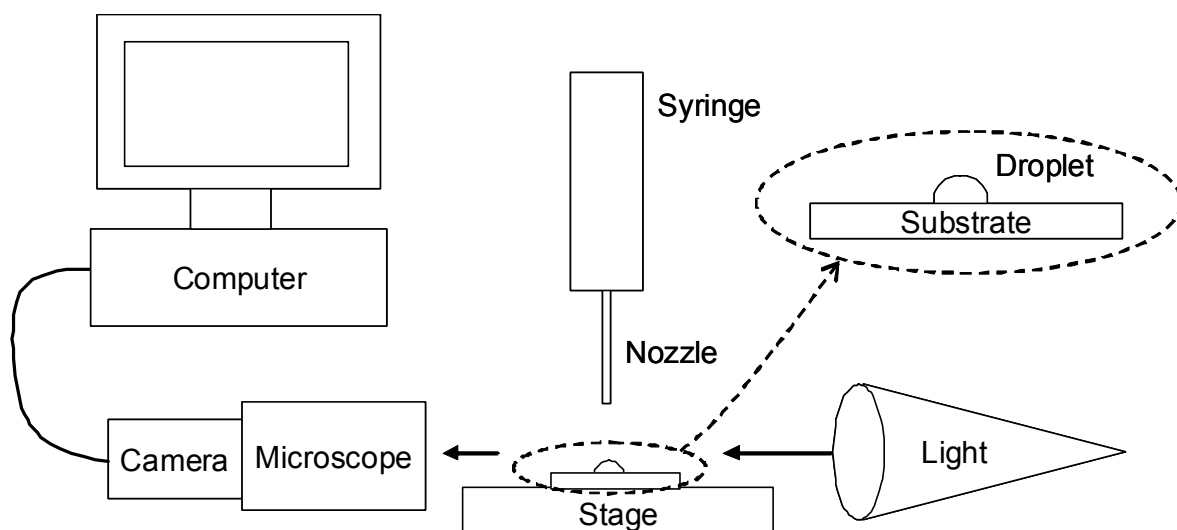


図 2-7 静的接触角の測定装置
Fig.2-7 Experimental setup for static contact angle measurement

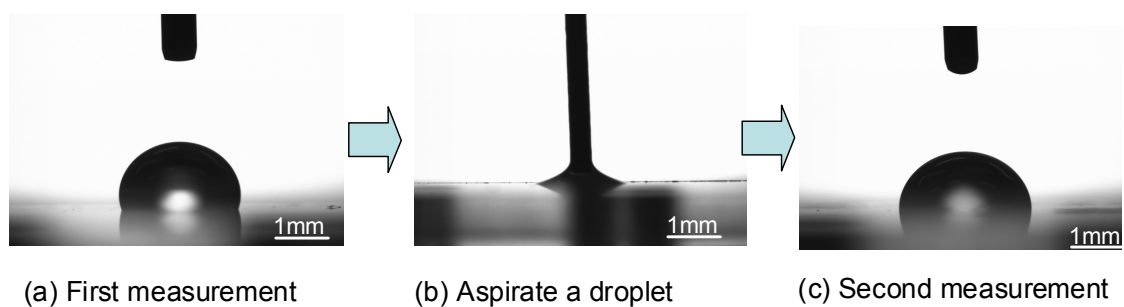


図 2-8 静的接触角測定時の液滴

Fig.2-8 Photographs of droplet at static contact angle measurement

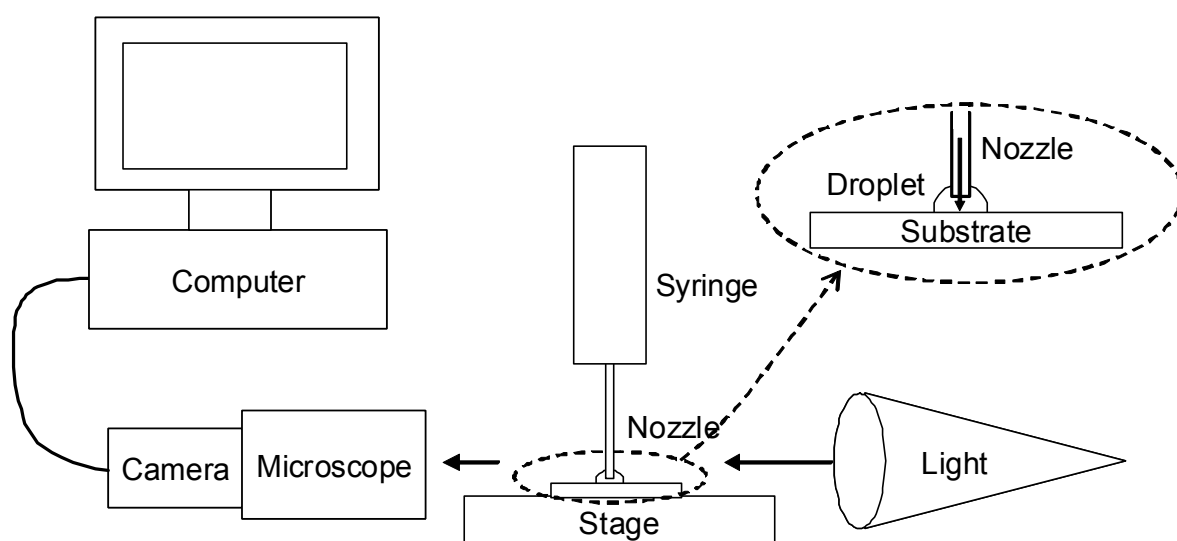


図 2-9 拡張前進角の測定装置

Fig.2-9 Experimental setup for extension advancing angle measurement

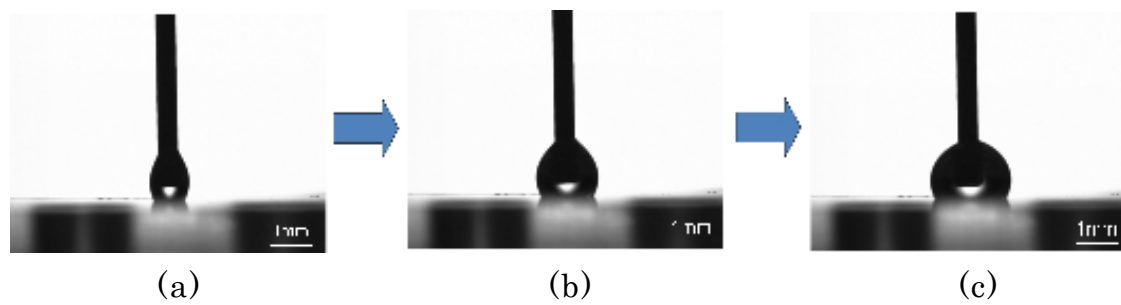


図 2-10 拡張前進角測定時の液滴
Fig.2-10 Photographs of extending droplet

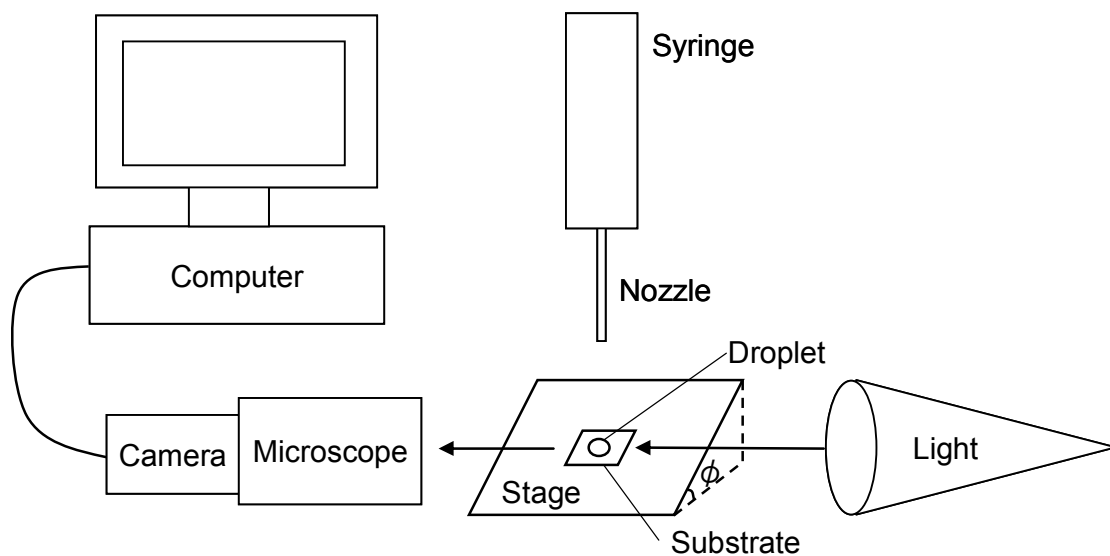
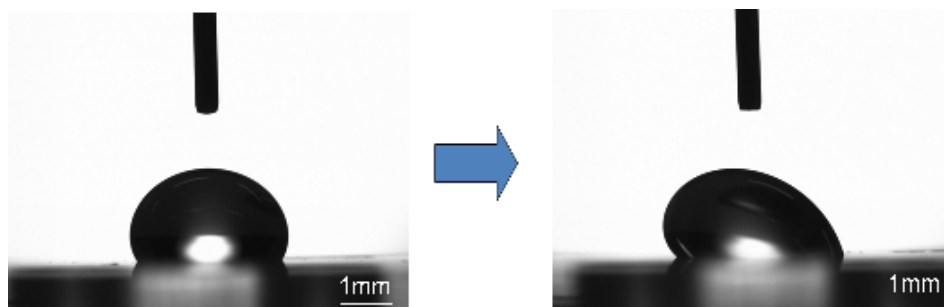


図 2-11 滑落角の測定装置
Fig.2-11 Experimental setup for sliding angle measurement



(a) Initial state

(b) At sliding angle

図 2-12 滑落角測定時の液滴

Fig.2-12 Photographs of droplet at initial state and sliding angle

2.2.1 静的接触角および動的接触角の測定結果

1 回目の静的接触角、拡張前進角及び滑落角の計測結果を表 2.1 にまとめて示す。

表 2-1 静的接触角，拡張前進角および滑落角の測定結果

Table.1 Measurements results of Static contact angle, Extension advancing angle and Sliding angle

Treatment	Liquid	Static contact angle (first measurement)	Extension advancing angle [degree]	Sliding angle [degree]
No treatment	Distilled Water	88	99	2
	5% Plasma solution	86	99	1
	Plasma	84	99	1
Dimethyl silicone	Distilled Water	104	108	3
	5% Plasma solution	102	106	1
	Plasma	101	105	2
Fluoric resin	Distilled Water	116	121	31
	5% Plasma solution	115	124	38
	Plasma	114	120	26

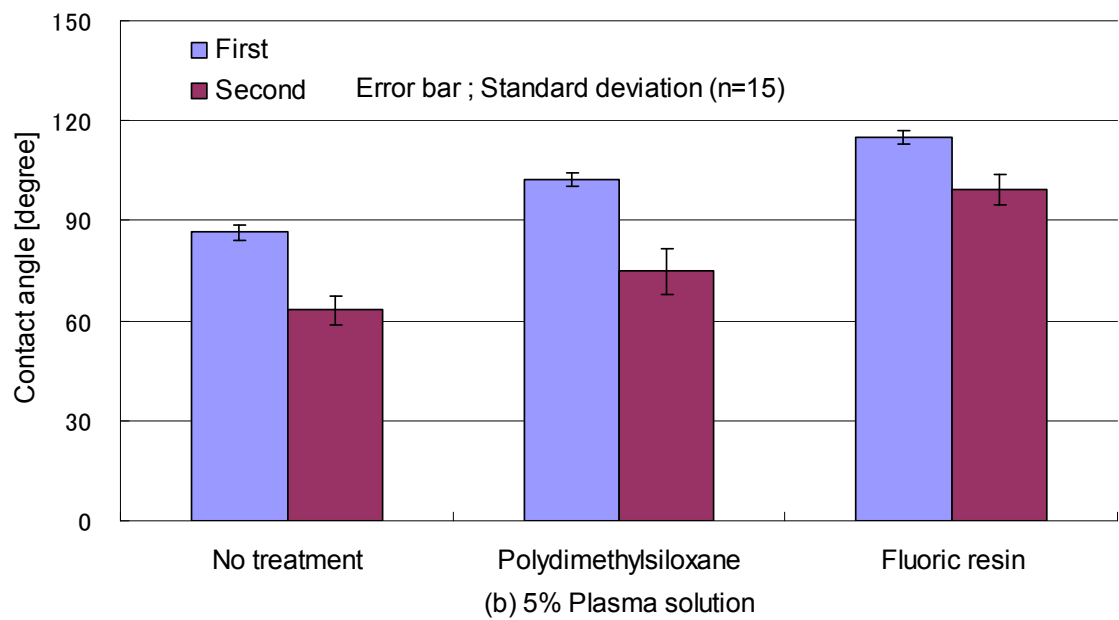
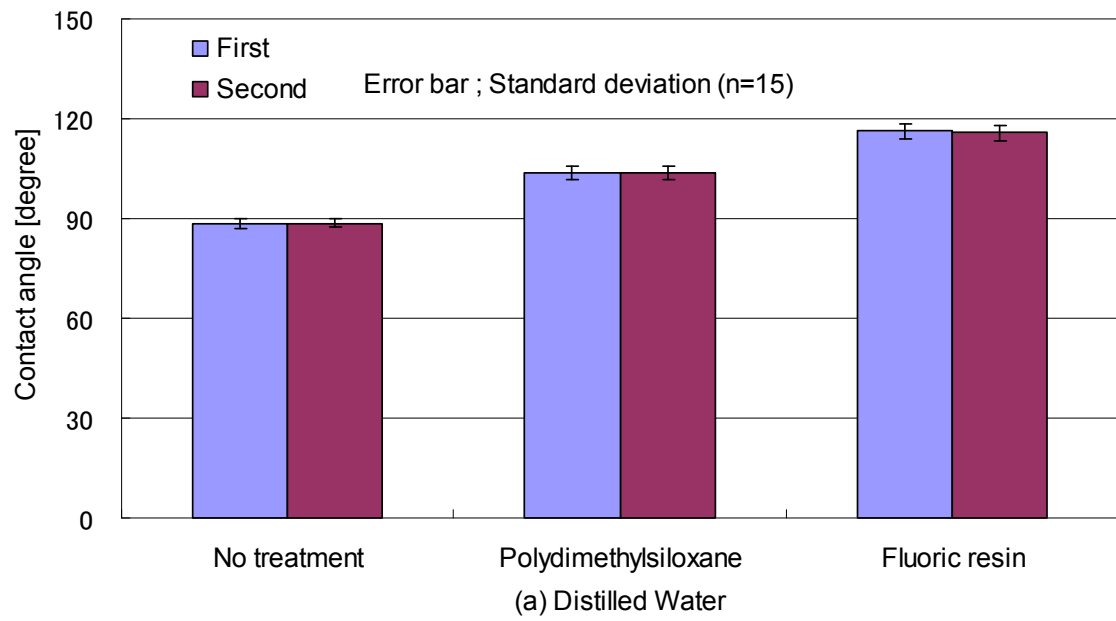
フッ素樹脂である FS-2010（アクリル樹脂）、とポリジメチルシロキサンである SH-20 を用いて表面処理した 15 枚のポリスチレン基板上に、蒸留水、5% 血漿水溶液および血漿を滴下した場合の接触角を図 2-13 に示す。血漿に含まれるタンパク質が基板に付着することにより、接触角の変化を計測することが目的であることから、1 度滴下して接触角を計測した後、滴下した溶液を接触角計のノズルを用いて除去した後に、再度同じ場所に滴下し、2 度目の計測を行った結果である。蒸留水の場合は、無処理の基板で 1 回目の平均値 88° （分散 1.7° ）であったものが 2 回目の平均値 89° （分散 1.2° ），ポリジメチルシロキサン処理基板で平均値 104° （分散 2.1° ）であったものが平均値 104° （分散 2.0° ），フッ素樹脂処理基板で平均値 116° （分散 2.1° ）から平均値 116° （分散 2.3° ），と 1 度目の滴下においても 2 度目の

滴下においても変化がなかった。しかし、血漿に関する計測結果は 1 回目の滴下では、表面処理をしていないポリスチレンの基板上での接触角は、平均 84° （分散 1.7° ）であるのに対して、ポリジメチルシロキサンで表面処理した場合には、平均 101° （分散 2.4° ）に増加した。また、フッ素樹脂で表面処理した場合には、平均 114° （分散 1.4° ）であった。表面処理が無い場合には、2 回目に同じ位置に滴下した場合の接触角は、 23° だけ減少して 61° （分散 9.5° ）となった。また、ポリジメチルシロキサンの場合には、 24° 減少して 73° （分散 7.2° ）となった。すなわち、2 回目の滴下時には表面は、親水性になっていると言える。一方、フッ素樹脂で表面処理した場合には、2 回目の接触角は 98° （分散 5.1° ）となり疎水性を維持できていると言える。

無処理の基板において、蒸留水の場合、静的接触角が 88° であったものが拡張前進角では 99° ，血漿の場合、静的接触角が 84° であったものが拡張前進角では 99° となった。ポリジメチルシロキサン処理基板において、蒸留水の場合、静的接触角が 104° であったものが拡張前進角では 108° ，血漿の場合、静的接触角が 101° であったものが拡張前進角では 105° であった。フッ素樹脂処理基板において、蒸留水の場合、静的接触角が 116° であったものが拡張前進角では 121° ，血漿の場合、静的接触角が 114° であったものが拡張前進角では 120° であった。拡張前進角は、表面処理が無い場合に蒸留水，血漿でそれぞれ 11° ， 15° だけ増加し、同様にポリジメチルシロキサンの場合には 4° ， 4° 増加、フッ素樹脂で表面処理した場合には、 5° ， 6° 増加となり、試料液の種類に寄らず疎水性が上がっていると言える。

無処理の基板において、蒸留水，5%血漿溶液，血漿の場合においてそれぞれ滑落角は、 2° ， 1° ， 1° であった。同様にポリジメチルシロキサン処理基板においては、同様に 3° ， 1° ， 2° であった。一方、フッ素樹脂処理基板においては、 31° ， 38° ， 26° であった。フッ素樹脂処理では、無処理およびポリジメチルシロキサン処理に比較して液滴と基板の接着力が大きいと言える。また、無処理およびポリジメチルシロキサン処理では試料液による接着力の違いは観られないが、フッ素樹脂処理では、試料液によって接着力が異なり、5%血漿溶液，蒸留水，血漿の順に接着力が大きいと言える。

上記の結果を総合的に判断すると、フッ素樹脂による表面処理により吐出後の血漿溶液の逆流を防止することができると言える。



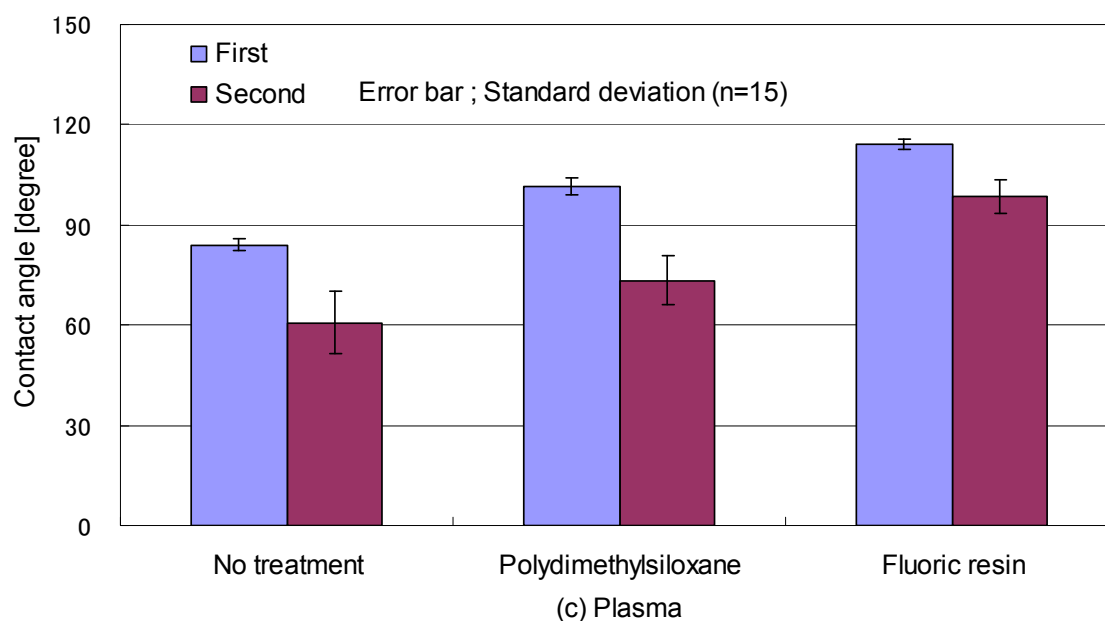


図 2-13 静的接触角の測定結果

Fig.2-13 Measurement results of static contact angle

2.2.2 マイクロディスペンサの設計

計量流路および狭窄部を設計するために、フッ素樹脂による疎水性処理を考慮した吐出圧力を求める。

まず、式(2)の圧力障壁の項 $-2\gamma \cos \theta_e (1/w + 1/h)$ を計算する。フッ素樹脂処理基板と 5% 血漿水溶液を用いて測定した拡張前進角は 124° であることから、狭窄部の流路巾と深さをともに $50\mu\text{m}$ と仮定して計算すると、圧力障壁は 3.0kPa である。同様に、静的接触角は、 115° であることから、式(1)に静的接触角を用いて圧力障壁を計算すると 2.3kPa であり、拡張前進角を用いる方が 0.7kPa 大きい。

一方、基板表面から試料液を引き剥がすのに必要な力は、固液界面と気液界面の境界線の周囲長、すなわち図 2-5 に示す境界線の長さに比例すると考えられる。図 2-14 に示すように滑落角における液滴では固液界面から気液界面へ置換される液滴の上方側半分の周囲長が固液

界面と気液界面の境界線の周囲長となる。固液界面が固気界面に切り替わる境界線, すなわち滑落角における液滴の周囲で生じる。そこで、液滴の周囲長あたりの力を滑落角測定から求める。滑落角において液滴に作用する力 N は下式より得られる。

$$N = Mg \sin \phi \quad (3)$$

ここに、 M は液滴の質量、 g は重力加速度、 ϕ は滑落角である
一方、固液界面から固気界面へと置換され境界線の長さ L は、液滴周囲長の半分であるので液滴の半径を r として、

$$L = \pi r \quad (4)$$

である。境界線の単位長さあたりに作用する力 K は、

$$K = N/L = (Mg \sin \phi) / (\pi r) \quad (5)$$

である。

計量流路の断面寸法を、巾 w_m 、深さ h_m とすると、吐出の際に界面置換される面の境界線の長さは流路断面の周囲長と同一であるので、計量流路内の界面置換境界線の長さ L_c は、

$$L_c = 2(w_m + h_m) \quad (6)$$

流路内の界面置換に必要な力 N_c は、式(5), (6)より、

$$N_c = KL_c \quad (7)$$

である。この力 N_c を圧力として計算すると

$$P_c = N_c / S_c = N_c / h_m w_m \quad (8)$$

ここで、 $w_m = h_m = 200 \mu\text{m}$ を仮定すると、圧力 P_c は 0.84kPa となる。

これらの計算から、計量流路、狭窄部の幅、深さをそれぞれ $200\mu\text{m}$, $50\mu\text{m}$ と仮定すると、静的接触角と式(1)を用いて計算できる吐出圧力が 2.3kPa であるのに対し、式(2)と拡張前進角および滑落角を用いて計算できる吐出圧力は、 3.9kPa と 1.6kPa 高いことが分かる。

本研究では、フタに用いるカバーシートの耐圧が 5kPa であることから、吐出圧力が 5kPa を下回るよう計量流路と狭窄部の寸法を決定する必要がある。また、計量する試料の液量は、血球計数検査において必要な希釈倍率を 250 倍、デバイス内で使用できる希釈液を最大 $50\mu\text{l}$ と想定し、マイクロディスペンサの計量する液量を 200nl と設定した。 200nl の液量と 5kPa 以下の吐出圧力を満たすため、計量流路の巾と深さを 200nm 、長さを 5mm とし、狭窄部の巾と深さを $50\mu\text{m}$ 以上とし、狭窄部の寸法と計量精度の関係を評価するため複数の寸法、すなわちと推定される $50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 \mu\text{m}$ を選択した。

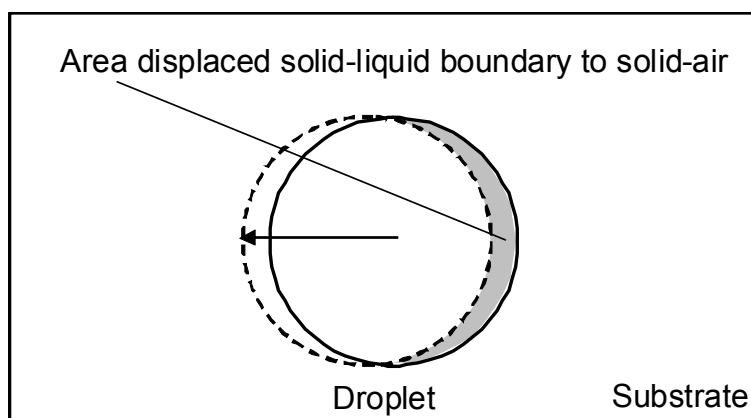


図 2-14 滑落角における液滴－基板間の界面置換

Fig.2-14 Replaced boundary face between droplet and substrate

2.3 マイクロディスペンサの作製

鋼材の切削加工により金型を作製し、それを用いた射出成形によりポリスチレン（HH-102, Japan PolyStyrene）成形品を2種類作製した。射出成形の工程概念図を図2-15に示す。鋼材性の金型にシリンダを用いて溶融した樹脂を射出充填（図2-15(a), (b)）し、冷却して樹脂を固化（図2-15(c)）した後、成形品を金型から取り出す（図2-15(d)）。作製したマイクロディスペンサの成形品写真を図2-16に示す。成形品は、外形は $20 \times 45 \text{ mm}$ で、1本の幹流路、4本の計量流路、6つの貫通孔を作製した。試料を流すための幹流路は両端で直径 2 mm の貫通孔と連通し、貫通孔は液体試料の入口および出口である。4本の計量流路は、一端で幹流路と直角に連通し、他端でそれぞれ直径 4 mm の貫通孔に連通させた。直径 4 mm の貫通孔は、混合チャンバとして利用する。

計量流路先端の狭窄部は、長さ $300 \mu\text{m}$ とし、微鏡写真を図2-16(b)に示す。狭窄流路の断面サイズは、4本の計量流路で異なり、それぞれ一辺が $50, 60, 70, 80 \mu\text{m}$ の矩形断面とした。同様に、狭窄部の寸法と計量精度の関係を評価するため、狭窄部が一辺 $80, 90, 100, 120 \mu\text{m}$ の矩形断面の成形品も併せて作製した。

ポリスチレン製のマイクロディスペンサ成形品に対する表面処理とカバーシートの接合の手順を図2-17に示す。図2-17(a)はポリスチレン成形品を計量流路と平行に切った断面図である。図2-17(b)は、表面処理を示す。フッ素アクリル樹脂（FS-2010, Fluoro Technology）及びポリジメチルシロキサン（SH-200, NACALAI TESQUE）の1% n-ヘプタン（NACALAI TESQUE）溶液をそれぞれ調製し、ポリスチレン成形品の流路が形成されている面にスプレー塗布した。その後、室温環境下で24時間乾燥させた。図2-17(c)は、カバーシートの接合を示す。流路の蓋となるカバーシートには、 $50 \mu\text{m}$ 厚のPET(polyethylene terephthalate)シートに $25 \mu\text{m}$ 厚のPDMSが平滑に積層されたシートであり、PDMSの自己粘着性を利用して接着剤なしに成形品に接合できる自己粘着シートを用いた。流路を下側に向け、混合チャンバとして用いる成形品の貫通孔に直径 0.5 mm のステンレス製ビーズを入れた。図2-17(d)に使用できる状態のマイクロディスペンサを示す。

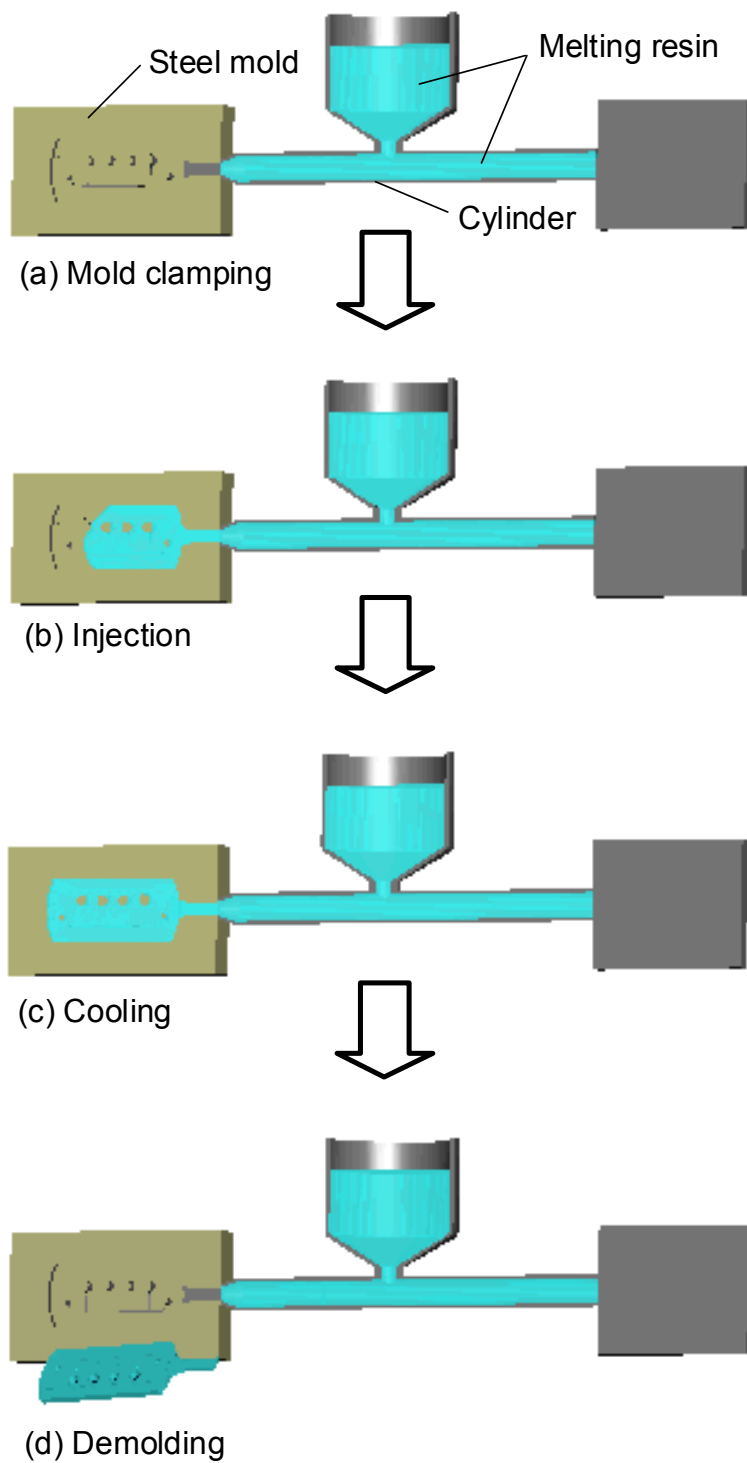
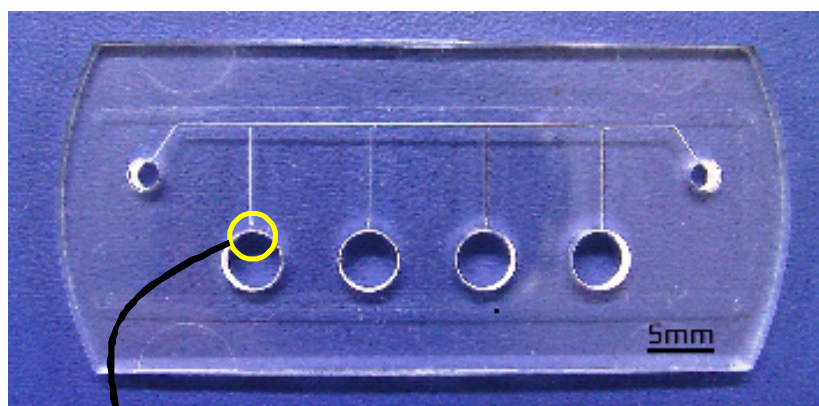
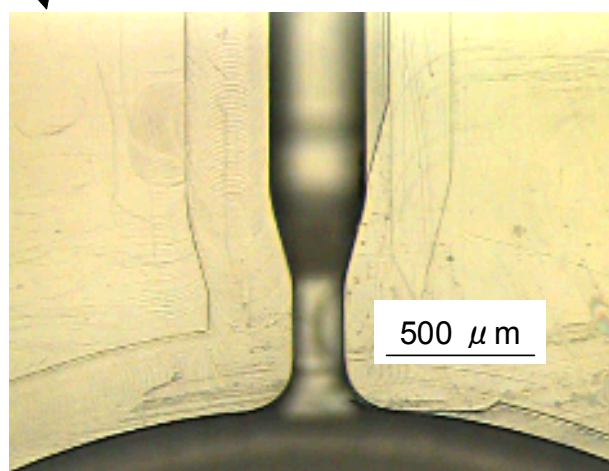


図 2-15 射出成形の工程概念図
Fig.2-15 Schematic of injection molding



(a) Polystyrene device



(b) Enlarged view of channel tip

図 2-16 マイクロディスペンサ成形品

Fig.2-16 Photographs of the molded microdispenser

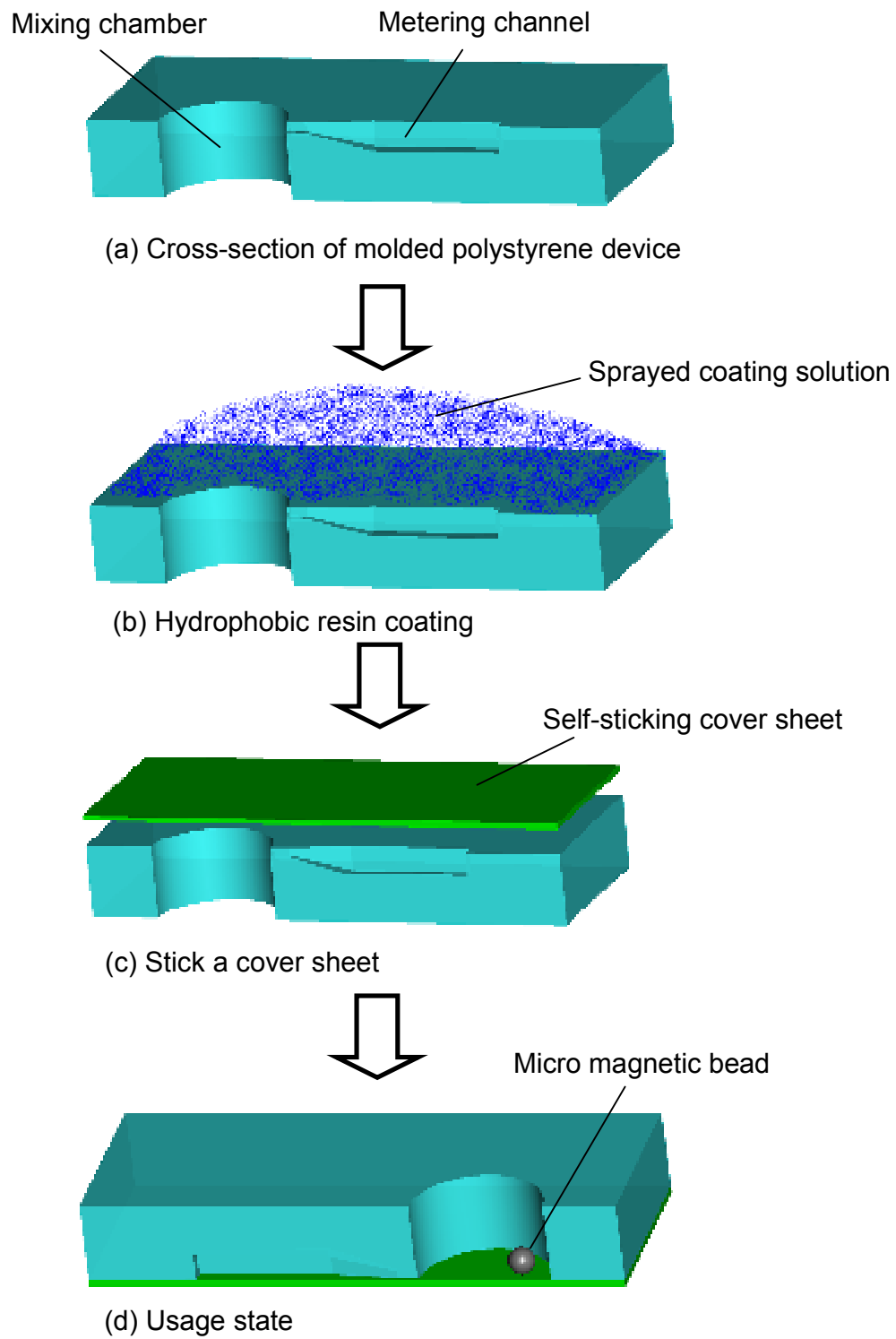


図 2-17 表面処理とカバーシート接合
Fig.2-17 Process of surface treatment and bonding

2.4 評価実験と結果考察

マイクロディスペンサの評価のため、計量流路から混合チャンバに吐出される液量を測定した。吐出液量は、計量する試料液体に予め色素を添加しておき、この色素が混合チャンバ内で蒸留水の希釈液でどの程度希釈されているかを希釈後の混合液の色素濃度を計測することによって測定した。色素濃度の計測には、混合液の吸光度測定を用いた。

色素を含み且つタンパク質を含む試料として青色 1 号 (TOKYO CHEMICAL INDUSTRY) と血漿をそれぞれ 0.3%, 5% の濃度で含む水溶液に調製した。この試料と作製したデバイスを用いた計量から希釈までの手順を図 2-18 に示す。図 2-18(a) に示すように、入口に 4 μ L の試料を滴下した後、同じ入口にポンプを接続して加圧する。このとき、混合チャンバと出口の空気口を開放しておく。すると、試料は計量流路と幹流路の両方向に進み、疎水性パッシブバルブの地点で停止する。更に加圧を続けると、図 2-18(b) に示すように幹流路内の試料は出口へ移動し、計量流路内の試料が孤立する。その後、混合チャンバにオートピペットを用いて 50 μ L の蒸留水を入れる。併せて、直径 0.5mm のステンレス製ビーズを混合チャンバに入れる。図 2-18(c) に示すように、この状態でアウトレットおよび使用しない計量流路 (図 2-18(c) 中、左から 1, 3, 4 番目) を密閉し、再び入口から加圧すると流路内の圧力が上昇し、試料が混合チャンバに吐出される。このときの吐出圧力を圧力計 (TDM-5000R, SURPASS) で測定した。そして、図 2-18(d) に示すようにステンレス製ビーズを外部磁力で回転させることにより、直ちに蒸留水と混合する。その後、混合チャンバで十分に攪拌された混合液をオートピペットで全量回収し、混合液の 630nm の吸光度を測定した。手順中、図 2-18(e) のように逆流を生じた場合は、逆流後に混合チャンバに残った液体を吸光度測定に用いた。これらの手順を 15 個のマイクロディスペンサを用いて繰り返し行った。

希釈手順中のインレットからポンプを外して大気圧に戻したとき、無処理とポリジメチルシロキサン処理において、混合液が計量流路へ逆流する現象が観察された。図 2-19 に逆流したときの計量流路先端の写真を示す。一方、フッ素樹脂処理チップでは、逆流は観察されなか

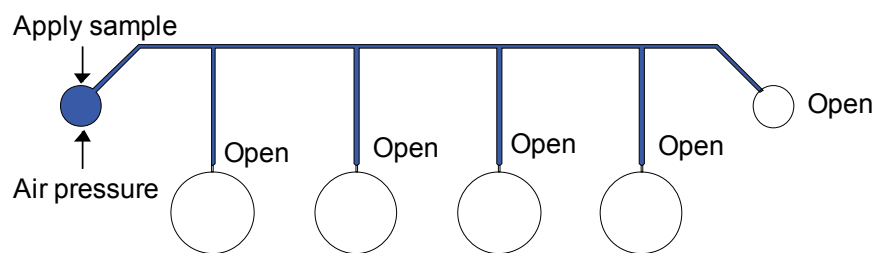
った。

吸光度測定値の再現性を変動係数（CV）値として図 2-20 に示す。無処理では、流路サイズによらず、変動係数が 5%を超える再現性しか得られず、逆流によって再現性が悪化していると考えられた。ポリジメチルシロキサン処理では、流路サイズが 100,120 μm の場合、変動係数が 3.3, 3.5%、90 μm 以下では 5%を超える結果であり、無処理同様、逆流が再現性を悪化させていると考えられた。フッ素樹脂処理では、流路サイズが一辺 80 μm のときに最良の再現性が得られ、変動係数が 1.25%であった。90 μm , 100 μm , 120 μm では、それぞれ、2.9%, 3.0%, 3.1%であった。70 μm 以下では、5kPa を超える圧力を加えても計量流路内の試料が動かず、フタである自己粘着性シートの接合面に浮きが発生して吐出できなかつたため、再現性を評価することができなかつた。狭窄部の寸法が大きい場合、試料を計量流路に充填する際の試料の停止位置が変化するために再現性が悪化すると考えられた。狭窄流路の直前で試料がストップする場合と狭窄流路にわずかに侵入した位置で試料がストップする場合があります、疎水性パッシブバルブの圧力障壁が小さくなり過ぎたためと考える。

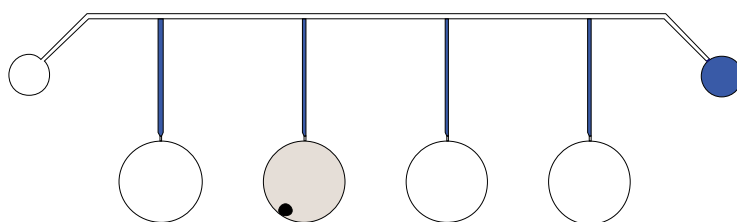
フッ素樹脂処理において逆流が生じないという結果は、無処理及びポリジメチルシロキサン処理では、2 度目の接触角が 90° 以下と親水性を示すのに対しフッ素樹脂処理では 90° を越えて疎水性を保持しているという静的接触角の測定結果と一致した。従って、静的接触角を同一の場所で 2 回繰り返して測定する評価方法は、逆流防止機能を有する表面処理を選択するための評価指標として有効に利用できると思われる。

フッ素樹脂処理の場合の、静的接触角と式(1)から計算できる吐出圧力の計算値、拡張前進角、滑落角と式(2)を用いて計算される吐出圧力の計算値、および実測値を図 2-21 に示す。式(1)から計算できる吐出圧力の計算値が最小の値を示し、拡張前進角、滑落角と式(2)を用いた計算値が中間値を、実測値が最大値を示した。狭窄部の寸法が 80 μm のときの値と比較すると、式(1)の計算値、式(2)の計算値および実測値がそれぞれ、2.0kPa, 2.7kPa, 3.8kPa であった。の両方を用いて推定した値が最も式(1)の計算値よりも式(2)の計算値の方が実測値に近いこと

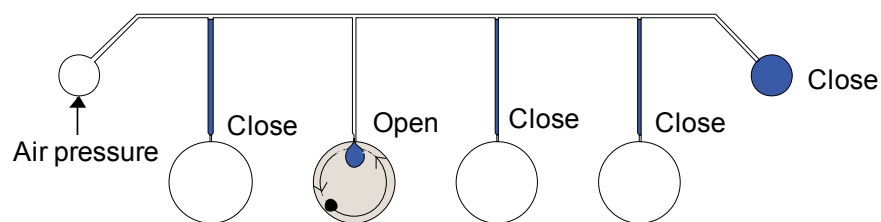
から、式(2)の妥当性が示されたと考えられる。しかしながら、依然として推定値と実測値に乖離があり、原因として、マイクロ流路内壁の表面粗さの影響が考えられる。表面粗さを持つ面では平滑な面と比較して、親水性の場合はより親水性に、疎水性の場合はより疎水性になることが知られている。このため、マイクロ流路内壁では、平滑面で測定された接触角よりも大きな（より疎水性の）接触角の状態ではあったと考えられる。実際にマイクロ流路内壁の表面粗さを共焦点顕微鏡で測定したところ、流路の天面では接触角を測定した平滑面と同様の表面粗さであったが、流路の側壁については測定することができなかった。流路の側壁は、射出成形金型を切削加工する際、切削バイトの側面が当たる箇所となり、表面が粗くなりやすい。また、磨き加工が困難な箇所である。射出成形を用いてマイクロディスペンサを作製するためには、金型加工に対する研究も併せて必要であると考えられる。



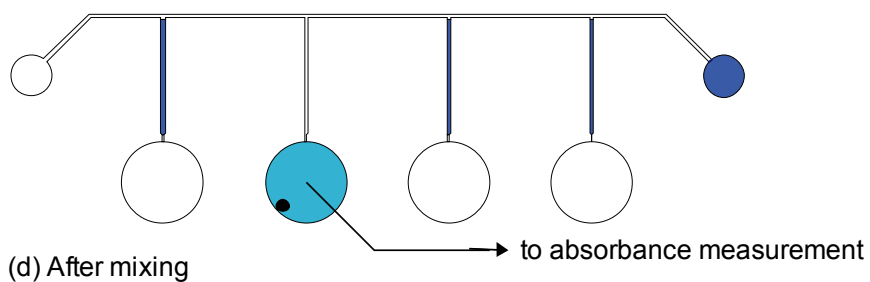
(a) Filling up channels by sample fluid



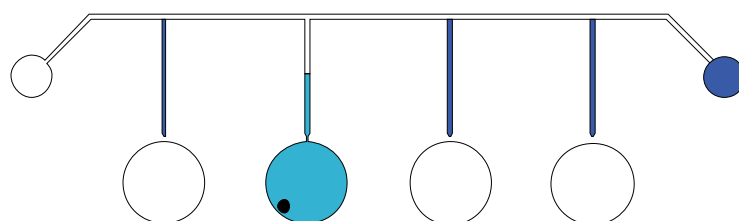
(b) Filling up a mixing chamber by distilled



(c) Discharge and mixing



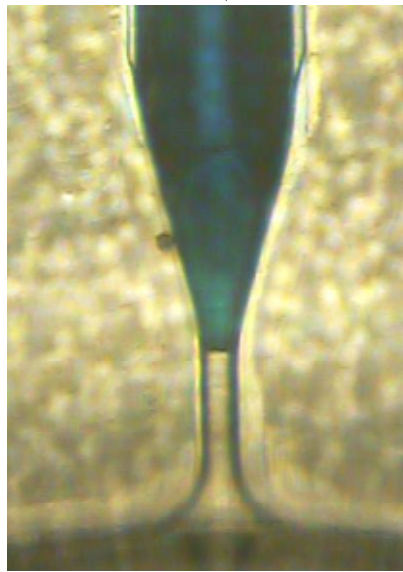
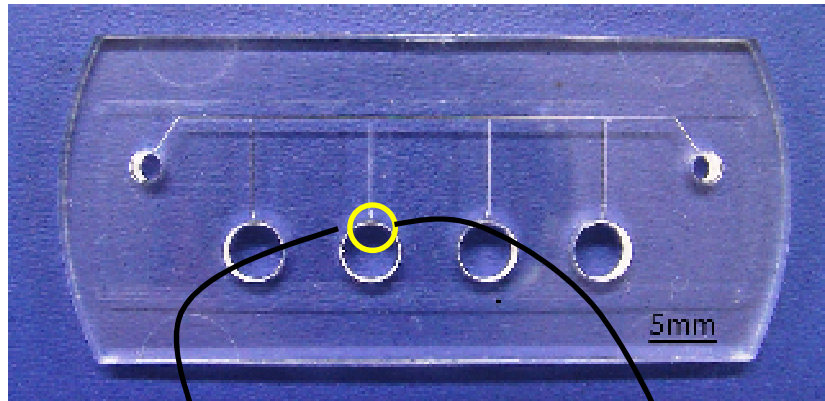
(d) After mixing



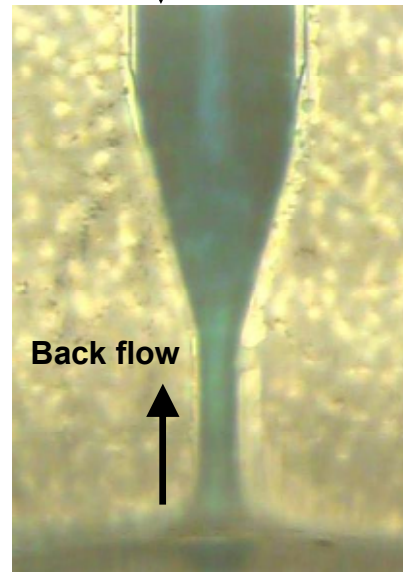
(e) Back flow

図 2-18 評価手順

Fig.2-18 Process flow of the evaluation



(a) Before discharge



(b) Back flow after discharge

図 2-19 逆流時の計量流路先端写真
Fig.2-19 Photographs of back flow

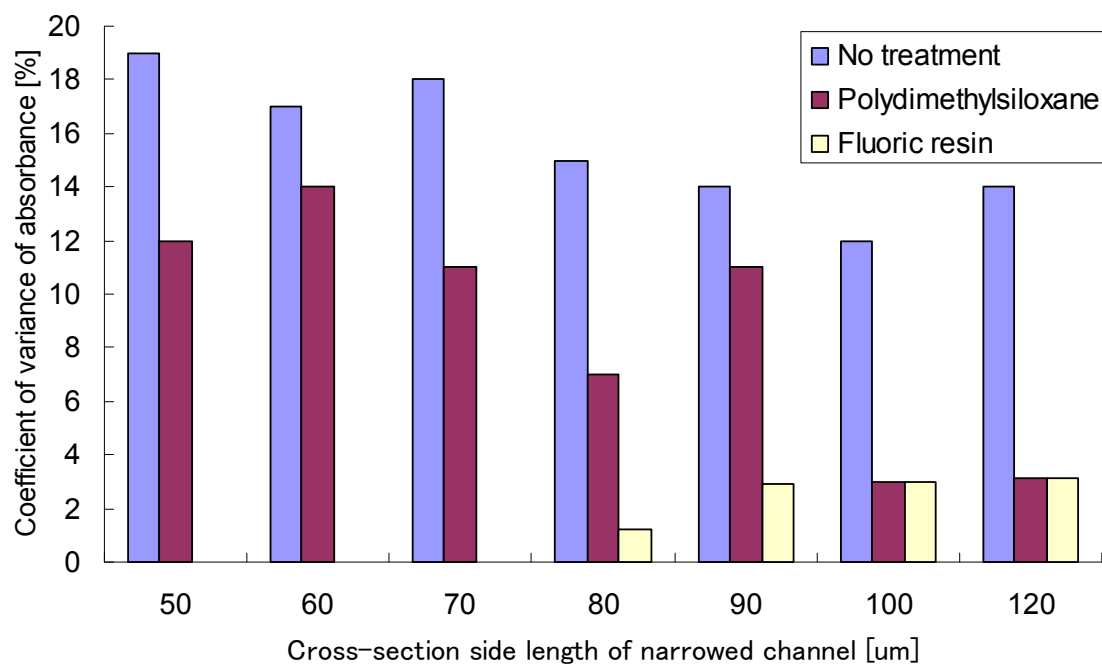


図 2-20 計量流路先端径，表面処理別の吐出液量の変動係数

Fig.2-20 Reproducibility of discharged fluid volume

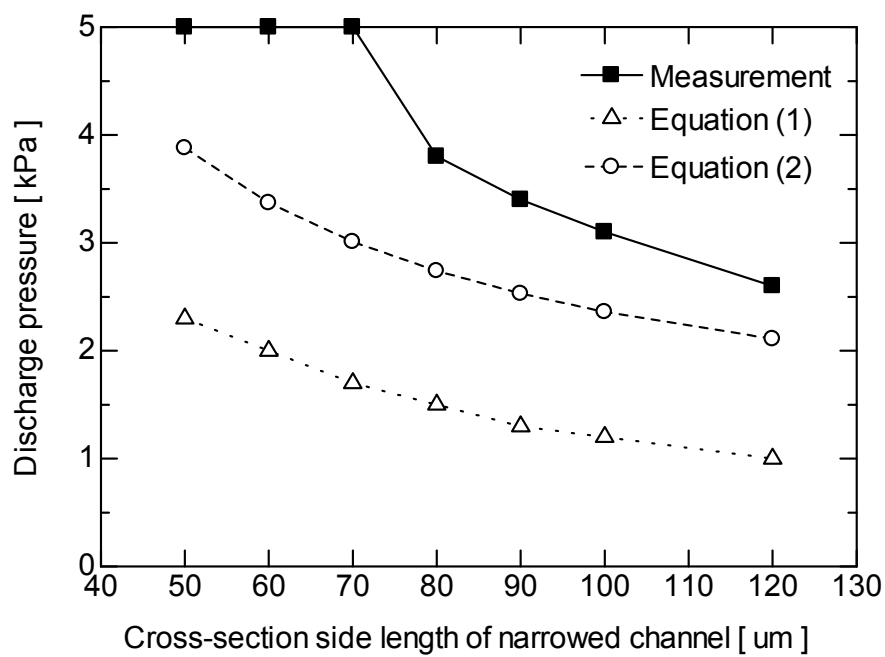


図 2-21 フッ素樹脂処理における吐出圧力の推定値及び実測値

Fig.2-21 Estimation of discharge pressure and measurement results

2.5 結言

フッ素樹脂を用いて表面処理したポリスチレン製成形品からなるマイクロディスペンサを作製し、血漿試料を用いた評価により、200nLの血漿試料を変動係数 1.25% (n=15) の再現性で計量可能であった。再現の良い計量には、血液試料が通過した後のマイクロ流路に毛管力が生じるのを防止し、逆流を防止する必要がある、フッ素樹脂を用いた表面処理によって血液中のタンパク質のマイクロ流路への吸着を抑制することによって逆流を防止できることを示した。

この毛管力の生成を防止できる表面処理方法を選択するための評価指標として、静的接触角を 2 回繰り返し測定する方法を提案した。2 回目の静的接触角が 90° を越え、疎水性を保持しているフッ素樹脂表面処理を施したマイクロディスペンサにおいて、血漿を用いても逆流を生じないことを示し、評価指標の有効性を示した。

加えて、マイクロディスペンサの設計段階で必要となる吐出圧力の計算方法として、拡張前進角と滑落角を用いた式を提案した。血漿試料を用いた評価を行い、従来の静的接触角を用いた疎水性パッシブバルブの圧力障壁の計算方法よりも実測値に近い推定が可能となった。

本章で作製したマイクロディスペンサは、射出成形という安価に大量生産可能な製法で作製可能な簡易な構造を有し、ポリスチレンという安価な材料を用いており、かつ簡易な表面処理によって血液試料への適用を可能とするものである。また、本研究のマイクロディスペンサは、血漿試料を再現良く計量できる性能を有していることから、低コストと信頼性、および血液試料への適用という POCT デバイスに求められる 3 つの課題を克服したものであり、集積化された血液検査デバイスの一要素として利用できる。

参考文献

- [1] S. P. Swierkowski, A micromachined drop dispenser for biofluidics, *Biomed Microdevices* 4:1 (2002) 55-61.
- [2] B. Samel, V. Nock, A. Russom, P. Griss, G. Stemme, A disposable lab-on-a-chip platform with embedded fluid actuators for active nanoliter liquid handling, *Biomed Microdevices* 9:61 (2007) 61-67.
- [3] C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger, S. R. Quake, A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion, *PNAS* 99(26) (2002) 16531-16536.
- [4] A. Puntambekar, J. W. Choi, C. H. Ahn, S. Kim, V. Makhijani, Fixed-volume metering microdispenser module, *Lab Chip* 2 (2002) 213-218.
- [5] M. Yamada, M. Seki, Nanoliter liquid metering in microchannels using hydrophobic patterns, *Anal. Chem.* 76 (2004) 895-899.
- [6] S. W. Park, J. H. Lee, H. C. Yoon, B. W. Kim, S. J. Sim, H. Chae, S. S. Yang, Fabrication and testing of a PDMS multi-stacked hand-operated LOC for use in portable immunosensing systems, *Biomed Microdevices* 10 (2008) 859-868.
- [7] Ikada Y., Interfacial problems of biomaterials, *Hyomen Kagaku* 20(9) (1999) 584-591.
- [8] Sigal G. B., Mrksich M., Whitesides G. M., Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents, *J. Am. Chem. Soc.* 120(14) (1998) 3464-3473.
- [9] H. Y. Erbil, Surface chemistry of solid and liquid interfaces, first ed., Wiley-Blackwell, 2006.
- [10] D. Quere, Drops at rest on a tilted plane, *Langmuir* 14 (1998) 2213-2216.

- [11] N. Yoshida, Y. Abe, H. Shigeta, A. Nakajima, H. Ohsaki, K. Hashimoto, T. Watanabe, Sliding behavior of water droplets on flat polymer surface, J. AM. CHEM. SOC. 128 (2006) 743-747.

第3章 マイクロミキサ

3.1 緒言

マイクロ流路内で複数の液を混合するためには、流れのレイノルズ数が非常に小さいため、物質拡散に依存せざるを得ない^[1]。マイクロ流路内において混合を行うことを目的に様々なマイクロミキサが提案されている。これらのマイクロミキサは、混合を促進させるための駆動源を有するアクティブミキサと駆動源を持たないパッシブミキサに大別される^[2]。

パッシブミキサは、複雑な構造を流路内に設けることにより物質拡散を促進したり流路内に渦を発生させたりするもの^{[2][3]}である。Wong ら^[4]、Bothe ら^[5]、及び Hoffmann ら^[6]は、T字型の流路部に液と液を合流させることにより混合させたい2種類の試料の間の界面の面積を増大させることで物質拡散を促進させるために、図 3-1(a)に示す様な構造を提案している。また、Schonfeld らは、異なる2本の流路をそれぞれ流れる2種類の試料が、2本の流路が1つの流路に合流する界面において拡散が促進されることを利用し、図 3-1(b)に示す様に分岐と合流を繰り返す構造を提案している^[7]。更に、Bhagat ら^[8]、Wang ら^[9]、及び Chen ら^[10]は、前述の二つの原理を組み合わせ、分岐と合流を繰り返す構造として、流路内に障害物としてピラー等を設けた図 3-1(c)に示す様な構造を提案している。これらの研究例以外にも、T字型流路と障害物を組み合わせる構造^[11]、流路に溝を設けることにより渦様の流れを誘起させる構造^[12]、流路内に親水性・疎水性のパターンを形成することにより流路内に溝を設ける構造と同様に、図 3-1(d)に示す様に渦を流路内に生成する構造^[13]、等がパッシブミキサの構造として提案されている。

しかしながら、これまで提案されているミキサの構造と原理は、十分な混合性能を得るため、マイクロ流路内に複雑な流路構造を設けることが必要である。更に、パッシブミキサの場合、混合を促進する構造を設けているが、実質的には拡散を利用していることから流路長が長くなるという課題がある。

一方、アクティブミキサは、外部に駆動源を必要とするが、単純な流路構造により混合を実現することが可能であり、混合時間が短くなるという特徴を有する^{[2][3][14][15]}。Sheen ら^[16]は、非対称構造の障害物をマイクロ流路内に設け、図 3-2(a)に示す様に、圧電素子を用いてマイクロ流路壁に振動を与えることにより混合を促進させる方法を提案しているが、マイクロ流路内に障害物を設ける必要がある。また、Yang ら^{[17][18]}は、図 3-2(b)に示す様に、PZT 圧電素子をシリコン製メンブレンに接着し、流路壁を加振することにより、混合する方法を提案している。しかし、Yang らの方法は、渦を生成することができないため効果的な混合を行うことが困難である。Lutz ら^[19]、及び、Oberti ら^[20]が提案している周波数の低い振動を与える方法は、図 3-2(c)に示す様に、マイクロ流路を加振するために音響スピーカーを利用しているが、装置が大型化するとともに、壁面材料や壁面との空隙による減衰などが課題であり、有効な混合方法とは言えない。Sundaram らは、T 字型流路を二つ組み合わせた十文字型のマイクロ流路内に形成した電極を用いて、電気泳動を用いて混合を行うという方法を提案しているが、(図 3-2(d)参照) 電気泳動力は、電極表面近傍のみに働く力であり、流路内の液全体を混合するために必要な駆動力を加えることができないという問題がある^[21]。

上述したように、これまで様々な混合用デバイスの構造と原理が提案されているが、有効な混合構造は未だ実現されていない。

マイクロ流路内で、効率のよい混合を実現するには、図 3-3 に示す様に、流路内に混合を促進する粒子等を入れて、実際に混合の対象となる液の界面を切るように粒子を移動させることが必要である。

図 3-4 に示すように実際に直径 4mm 深さ 3.5mm の円形のマイクロチャンバ内に直径 0.5mm の磁性粒子を入れて、外部磁界を用いて蒸留水と血液の 2 液を混合した場合の実験方法を図 3-5 に示す。各流体の特性および用いた磁性粒子の諸データを表 3-1 にまとめて示す。

表 3-1 流体、磁性ビーズおよび混合チャンバの特性

Table.3-1 Properties of fluids, magnetic bead and mixing chamber

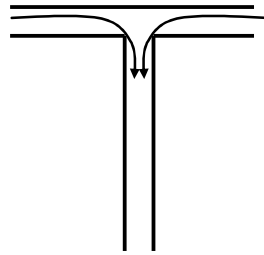
Fluid		Whole blood	Distilled water
	Mass density	1.06×10^3 [kg/m ³]	1.00×10^3 [kg/m ³]
	Viscosity coefficient	4.71×10^{-3} [Pa·s]	0.894×10^{-3} [Pa·s]
	Surface tension	6.92×10^{-2} [N/m]	7.25×10^{-2} [N/m]
Magnetic bead	Material	SUS430	
	Diameter	0.5 [mm]	
Mixing chamber	Material	Polystyrene	
	Diameter	4.0 [mm]	
	Depth	3.5 [mm]	

円筒状のマイクロチャンバとして図 3-6 に示す第 2 章で作製したマイクロディスペンサの混合チャンバを用い、蒸留水 24 μ L を混合チャンバに入れ、その後、全血 1 μ L を混合チャンバに静かに入れて、磁性ビーズを 300rpm で 20 秒間回転し混合した後、混合チャンバ内の試料 10 μ L をオートピペットで採取し、ヘモグロビンの吸収ピーク波長である 550nm の吸光度を分光光度計で測定した。

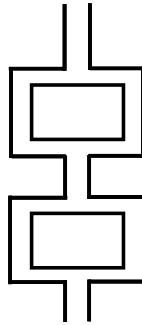
吸光度測定の結果を図 3-7 に示す。横軸は 15 回繰り返し行った結果の個々の測定を示し、縦軸は吸光度である。15 回の磁気ビーズによる混合実験の結果のヘモグロビンの吸光度は、ほぼ同一の値を示し、15 回の測定値の変動係数は、0.18% であった。

上述の流路内に置いた粒子を外部磁界により運動させることで混合を行う方法では、流路内に動く粒子を入れることが必要であるという課題があることから、粒子を入れたものと同様の混合時の流れ場を考案する必要がある。

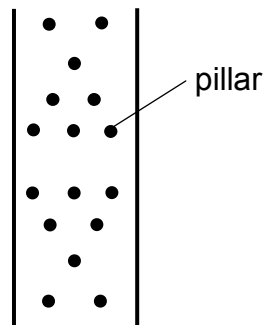
そこで、本論文では、局所的に異なる質量を流路構造体上に配することで、共振周波数の異なる振動構造を配置し、加振する周波数を変えることにより、振動領域を移動させることで、マイクロ流路内で混合する方法を提案し、その有効性を考察する。



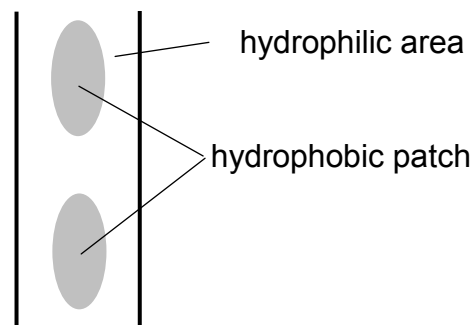
(a) T-shape channel mixer



(b) Split and -and-recombine mixer



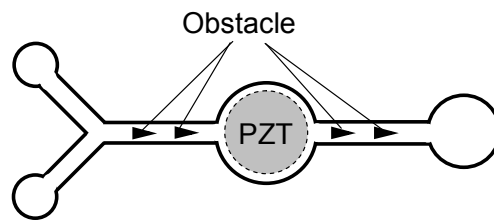
(c) Obstacle mixer



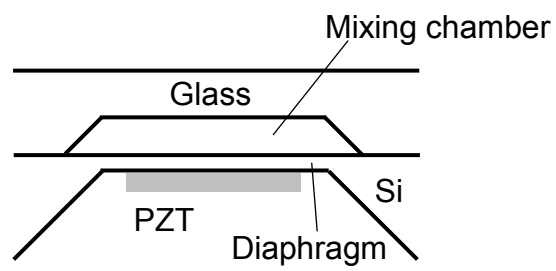
(d) Hydrophilic-hydrophobic pattern mixer

図 3-1 パッシブミキサ

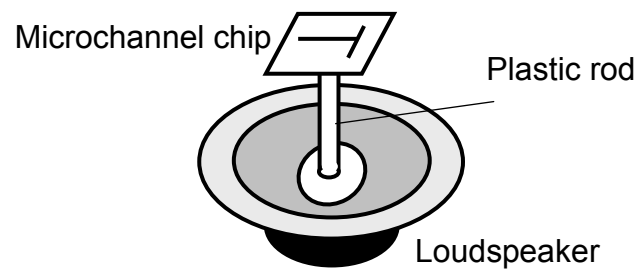
Fig.3-1 Various passive mixers



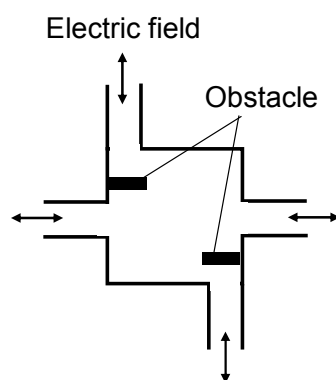
(a) Oscillation and obstacles mixer



(b) Diaphragm oscillating mixer



(c) Loudspeaker mixer



(d) Electrophoretic mixer

図 3-2 アクティブミキサ
Fig.3-2 Various active mixers

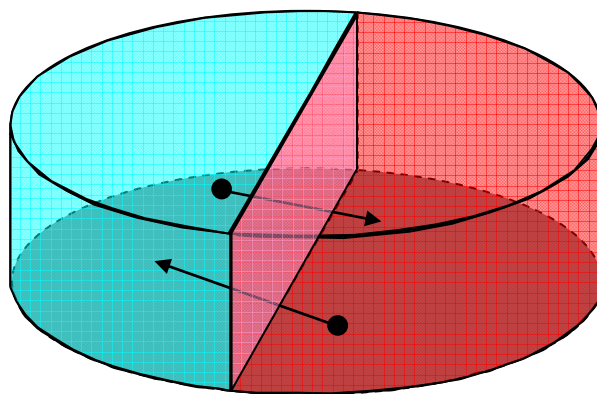


図 3-3 二液の界面を横切る粒子による混合の概念図

Fig.3-3 Conceptual diagram of mixing by particle's motion cutting across boundary face of two different fluids

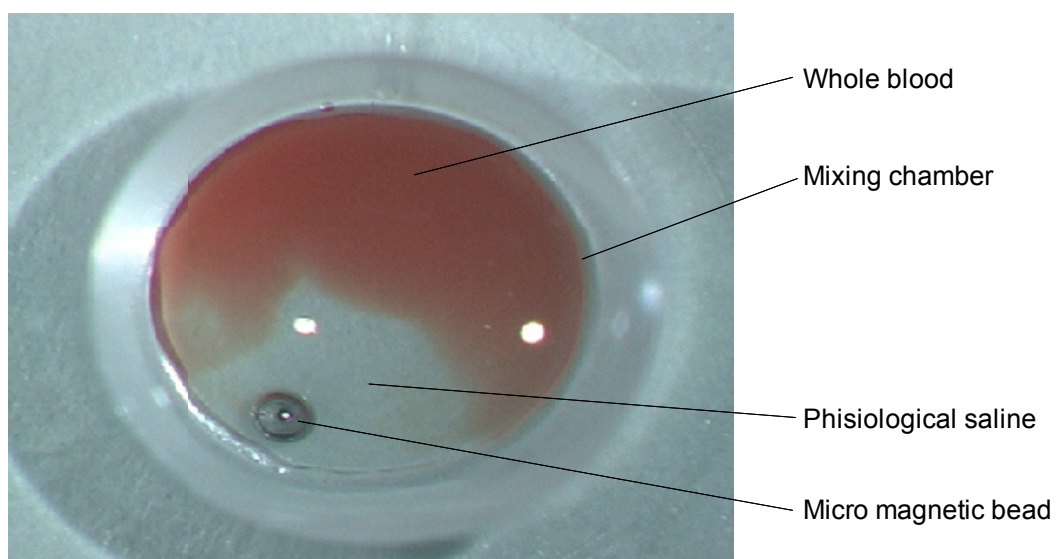


図 3-4 微小磁性ビーズを用いたマイクロミキサ

Fig.3-4 Photograph of a micro-mixer using micro magnetic bead

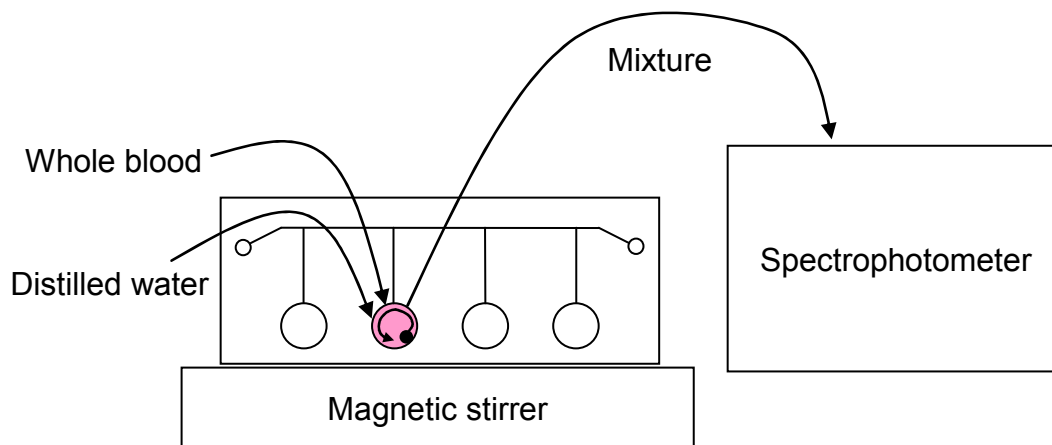


図 3-5 磁性粒子を用いた混合実験手順
 Fig.3-5 Procedure for mixing experiment using magnetic bead

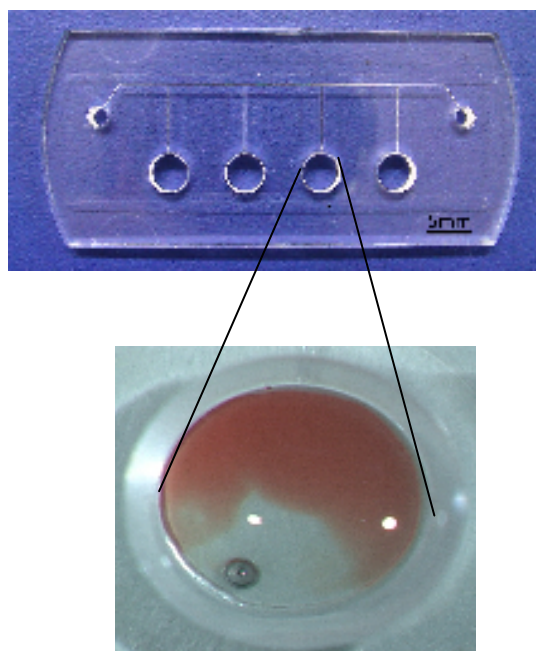


図 3-6 マイクロディスペンサ成形品
 Fig.3-6 Photographs of the molded microdispenser

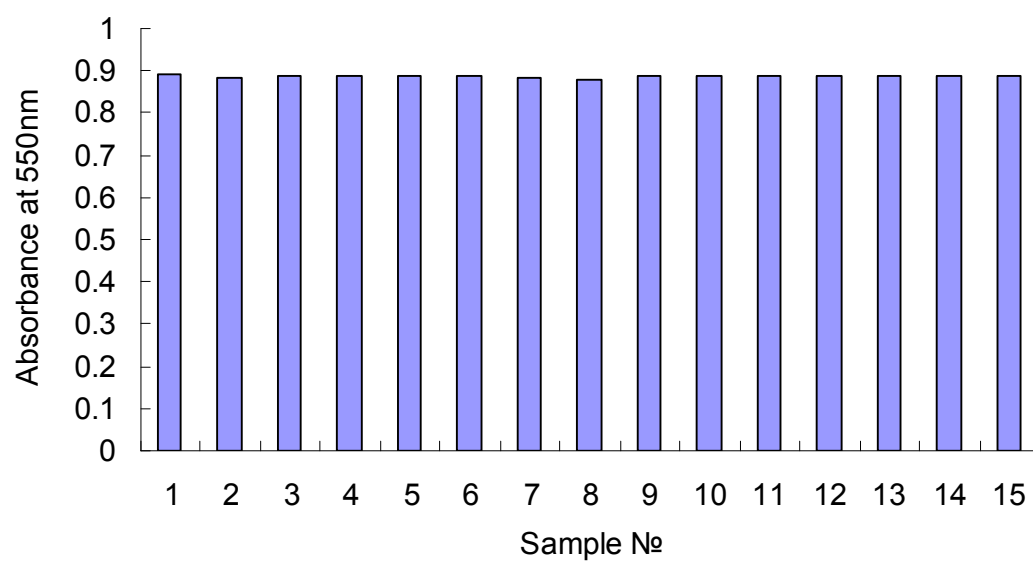


図 3-7 混合後溶液の 550nm における吸光度

Fig.3-7 Absorbance of mixed fluid at 550nm

3.2 実験

3.2.1 質量分布型ミキサの構造と原理

図 3-8 に示すように、点 Q で固定されたバネに質量 m の質点 P を取り付け、水平面上で x 軸方向に振動する系を考え、点 Q を角振動数 ω_0 、振幅 a_0 で変位させたときの点 Q の平衡位置からのずれが $x_0(t)=a_0\cos\omega t$ で表されたとすると、質点 P の運動方程式は、式(1)で表される。

$$m\ddot{x} = -k(x - x_0) - c\dot{x} \quad \text{すなわち} \quad \ddot{x} + \frac{c}{m}\dot{x} + \frac{k}{m}x = \frac{k}{m}a_0\cos\omega t \quad (1)$$

ここに c は、材料の構造減衰や構造物が接する流体に依存した変形抵抗による減衰係数である。式(1)において、 $c/m=2\gamma$ 、 $k/m=\omega_0^2$ と書けば、式(1)は、式(2)と書ける。

$$\ddot{x} + 2\gamma\dot{x} + \omega_0^2 x = \omega_0^2 a_0 \cos\omega t \quad (2)$$

(2)の解を

$$x = Ae^{i\omega t} \quad (3)$$

と仮定して(2)に代入すると

$$A = \frac{\omega_0^2 a_0}{(\omega_0^2 - \omega^2) + 2i\gamma\omega} = \frac{\omega_0^2 a_0}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + 4\gamma^2\omega^2}} e^{-i\phi} = |A|e^{-i\phi} \quad (4)$$

のとき式(3)は式(1)の解となる。なお、式(4)中の ϕ は偏角で

$$\tan\phi = \frac{\gamma\omega}{\omega_0^2 - \omega^2} \quad (5)$$

である。ここで、Q の振幅 a_0 と P の振幅 $|A|$ の比を求めると

$$\frac{|A|}{a_0} = \frac{\omega_0^2}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + 4\gamma^2 \omega^2}} \quad (6)$$

となる。減衰係数が十分小さい ($\gamma \ll \omega_0$) ときの式(6)を図示したのが、図 3-9 であり、 $\omega = \omega_0$ のとき、すなわち加振周波数が系の共振周波数と一致するとき、大きな振幅が得られることが分かる。

構造物を有限要素法のように離散化した系を用いて定式化した場合、式(1)は式(7)で表され、

$$M\ddot{U} + C\dot{U} + KU = F \quad (7)$$

ここに、 M は離散化した節点における質量、 U は各接点変位、 C は減衰係数、 K は剛性マトリックスである。本研究では、図 3-10(a)に示すような一様の厚み t の板の振動を考え、この板に、ある周波数の振動を与えると、共振周波数では、図 3-10(b)(c)に示す一次および二次の変形を生じる。共振周波数は板の厚みに依存しており、板の厚みを変えることで共振周波数を変えることができる。このことから、図 3-11 に示す様に、円周状に異なる厚みを有する領域がある円板に周波数を変えて加振する場合、振動による変形の最大変位の位置は板厚と与えた振動数に依存して移動すると考えられる。

例えば、図 3-12 に示すような 8 つの異なる厚みを持った突起を配置した円板の場合、平坦な円板にバネを介して異なる質量 $M_1, M_2, M_3, M_4, M_5, M_6, M_7, M_8$ が円形に配置された構造と等価であると仮定すると、突起付きの円板の振動は、質点 M_1 - M_8 の振動と円板の膜振動の連成振動であると考えることができる。すなわち、個々の質点に応じた周波数の振動を外部から与えることで、最大変位の位置を移動させることができると考えられる。

剛性と質量の異なる領域を分布させた板をマイクロ流路の底部に用い、外部から底部の変形を励振する周波数を変えることにより、最大変形部分を移動させることができ、その結果、流路内に渦を生成させることができると考えられる。

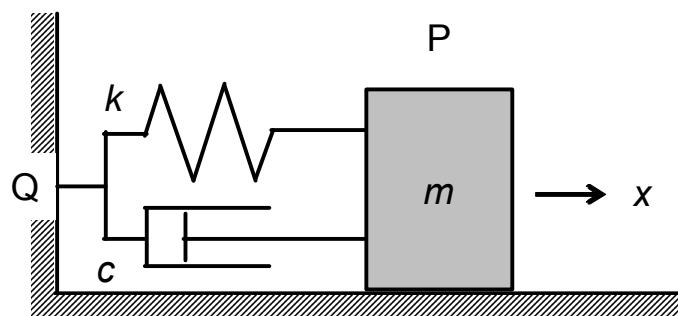


図 3-8 単振動の模式図
Fig.3-8 Simple harmonic motion

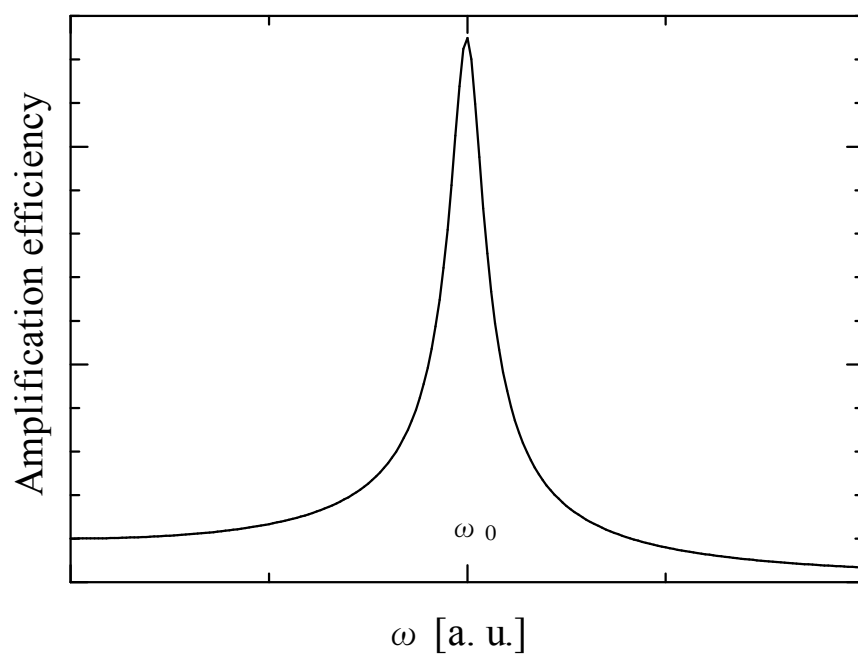


図 3-9 共振周波数
Fig.3-9 Resonance frequency

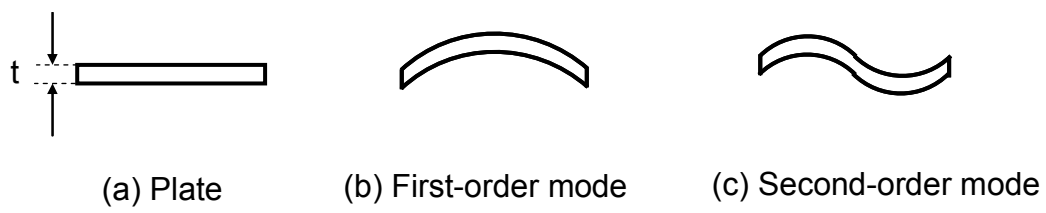


図 3-10 板の定在波
Fig.3-10 Standing wave of a plate

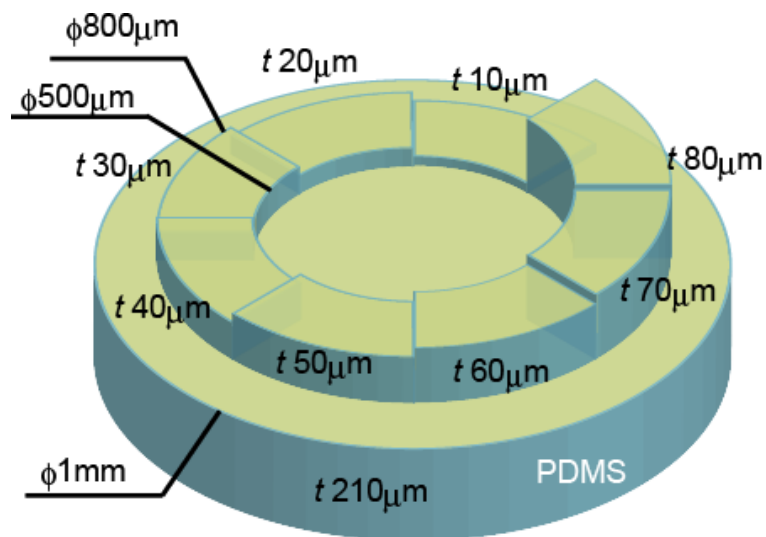
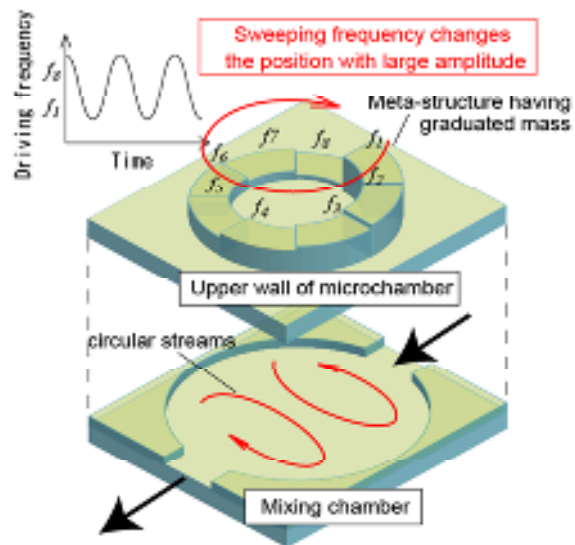
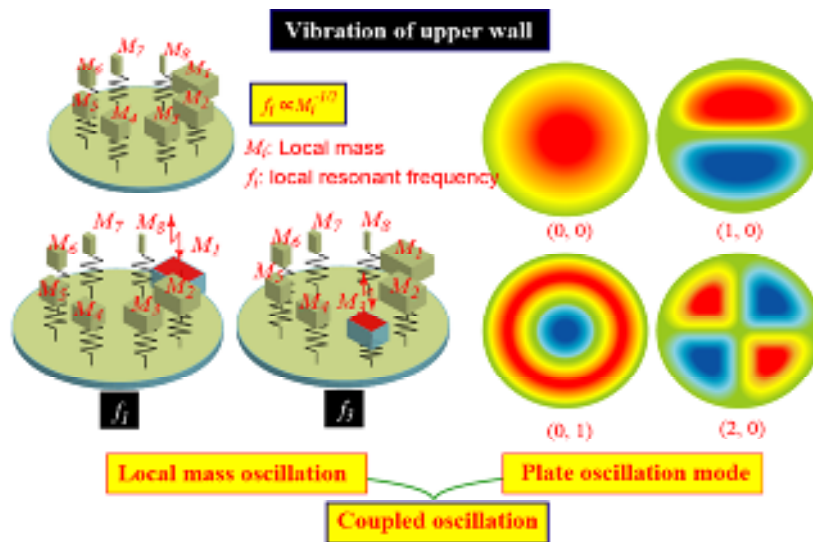


図 3-11 異なる厚みを組み合わせた壁
Fig.3-11 A plate consist of various thickness part



(a) Mixing chamber and upper wall



(b) Principle of coupled oscillation

図 3-12 質量分布型マイクロミキサ原理図

Fig.3-12 Principle of meta-structured mode modulation micro-mixer

3.2.2 有限要素法による強制振動時の変形解析

図 3-11 に示す厚さ 210 μm で直径 1mm の壁に内直径 500 μm ,外直径 800 μm の円形状に階段状に 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μm の 8 つの異なる厚みを持った突起が配置された円板の周波数応答を解析ソフト MSC MARC を用いて解析した。表 3-2 に示すように、PDMS の物性値として質量密度を 0.970 kg/m³, 弾性定数は 870 kPa, ポアソン比 0.499^[22]とした。図 3-13 に解析に用いた要素分布を示す。また、表 3-2 に解析時の条件を整理して示す。

表 3-2 有限要素法解析の条件

Table.3-2 Conditions of finite element method analysis

Material : PDMS	Mass density	0.970	kg/m3
	Young's modulus	870	kPa
	Poisson ratio	0.499	
Structure : Circular disk	Radius	500	um
	Thickness	210	um
	Internal radius of swells	250	um
	External radius of swells	400	um
	Hight of swells	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80	um
Analysis condition	Method	Finite element method	
	Mesh	Quadrilateral	
	Boundary condition	Circumference fixation	
	Displacement point	Center of circle at flat side	
	Displacement direction	z	
	Displacement amplitude	1	um
	Frequency range	100-20000	Hz

一連の加振周波数時における変位の最大変位部の移動の様子を各加振周波数毎に示した結果を図 3-14(a)から(l)に示す。各図中の白い領域と黒い領域は、図 3-15 に示すように円板の中心で直交する軸からの回転角 θ と中心からの距離 r を取り、凸側の最大変位位置と凹側の最大

変位位置を示している。加振周波数が 1840Hz の場合には、図 3-14(a) に示す様に $(r, \theta)=(230\mu\text{m}, 128^\circ)$ の位置において最大凸変位は $1.12\mu\text{m}$ となり、 $(r, \theta)=(220\mu\text{m}, 356^\circ)$ の位置において最大凹変位は $-0.93\mu\text{m}$ となっている。加振周波数を 1890Hz(図 3-14(b))から 2390Hz(図 3-14(1))まで段階的に上げていくことにより、最大凸変位の位置は $(r, \theta)=(230\mu\text{m}, 119^\circ)$ から $(r, \theta)=(250\mu\text{m}, 142^\circ)$ の位置まで周波数に依存して移動するとともに、変位量も $1.12\mu\text{m}$ から $1.88\mu\text{m}$ まで増加している。一方最大凹変位を生じる位置は $(r, \theta)=(230\mu\text{m}, 356^\circ)$ の位置から $(r, \theta)=(145\mu\text{m}, 343^\circ)$ の位置まで移動し、変位量は $-0.99\mu\text{m}$ から $-2.01\mu\text{m}$ に増加した。半径方向の移動は板厚の分布に依存していると考えられる。解析による凸凹の位置は相対的なものであり、それぞれ振動の変位の腹の部分の変位を意味し、ともにほぼ $\pm 1\mu\text{m}$ から $\pm 2\mu\text{m}$ まで変化する位置がある。この変位量は加振エネルギーに依存する。

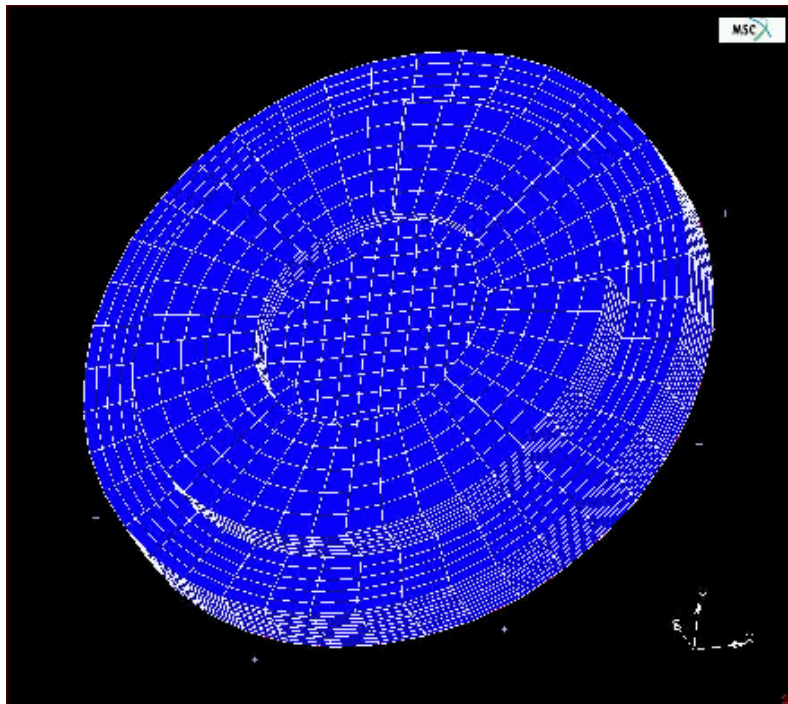
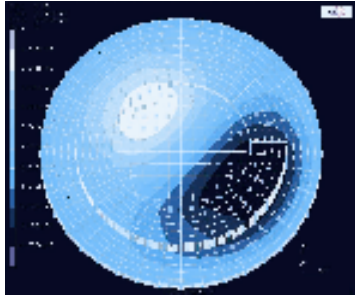
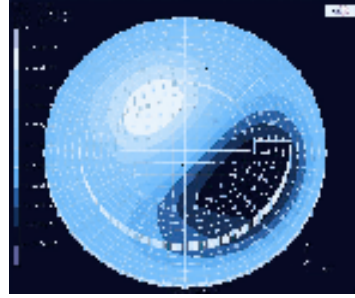


図 3-13 FEM 解析に用いたメッシュ構造

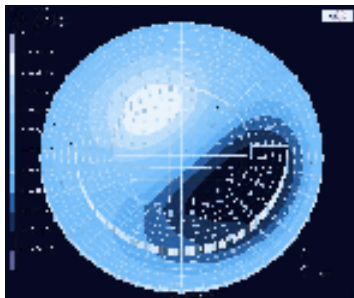
Fig. 3-13 Mesh structure for FEM analysis



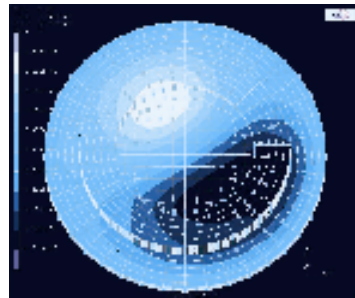
(a) 1840 Hz



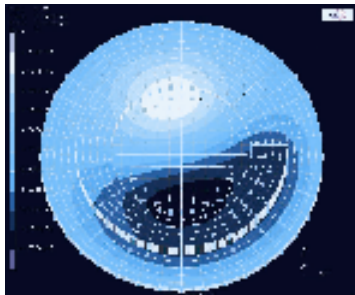
(b) 1890 Hz



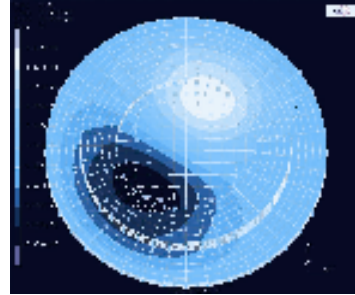
(c) 1940 Hz



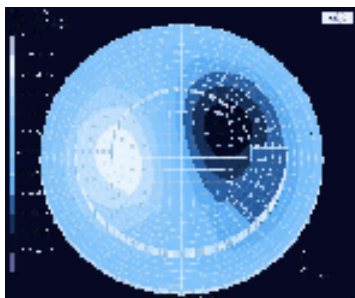
(d) 1990 Hz



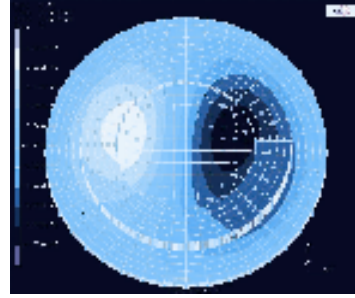
(e) 2040 Hz



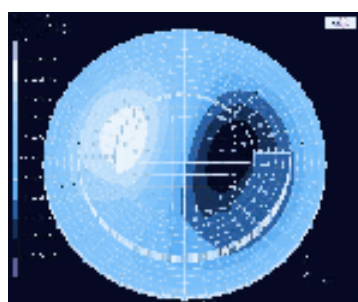
(f) 2090 Hz



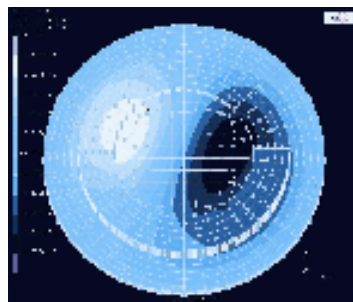
(g) 2140 Hz



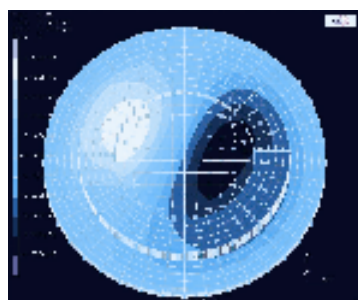
(h) 2190 Hz



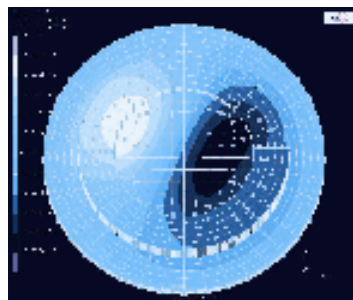
(i) 2240 Hz



(j) 2290 Hz



(k) 2340 Hz



(l) 2390 Hz

図 3-14 FEM 解析結果；加振時のマイクロミキサ凹凸分布

Fig. 3-14 Frequency response calculated by FEM analysis

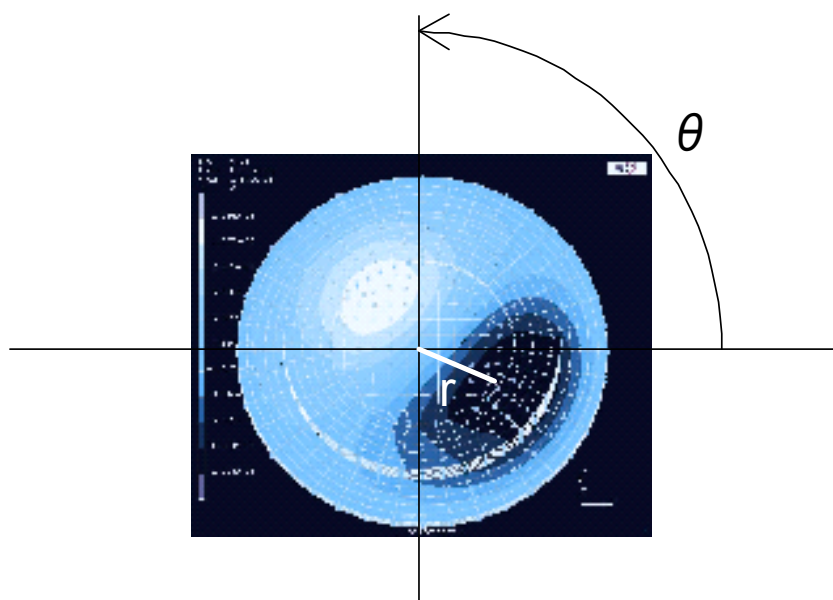


図 3-15 最大変位点を表すための座標系

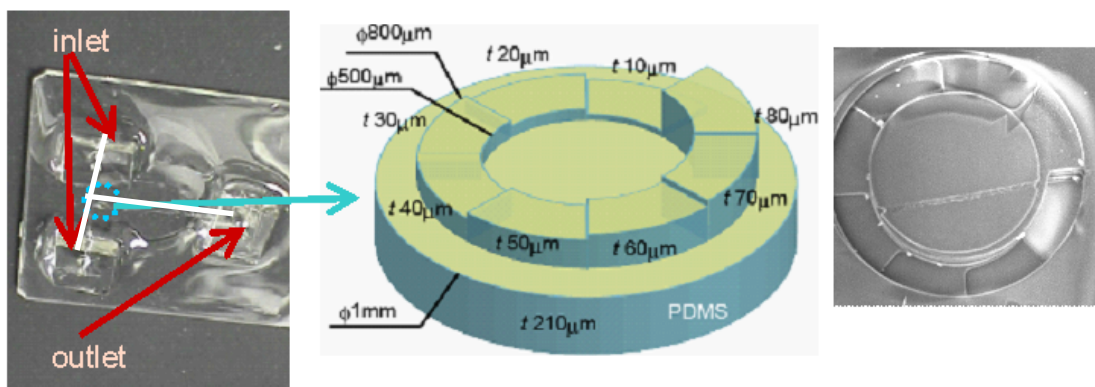
Fig. 3-15 Coordinate system to indicate max displace point

3.2.3 質量分布型ミキサの作製

解析結果に基づき、ソフトマイクロマシンプロセスを用いて板厚分布を有し、PDMS を材料とするマイクロミキサを作製した。

作製した PDMS 製マイクロミキサを図 3-16 に示す。図 3-16(a)は、マイクロミキサの全体図であり、白線で示す T 字型のマイクロ流路とマイクロ流路に溶液を流入させるための入口を有しており、T 字型流路の合流地点から 1mm の図中に点線円で示す位置に直径 1mm の混合チャンバ部を有する。図 3-16(b)は、混合チャンバ部の上壁にある質量分布構造を示しており、図 3-16(c)は、その顕微鏡写真である。図 3-16(d)は、混合チャンバ部の顕微鏡写真であり、溶液の入口、出口と混合チャンバの位置関係を示している。

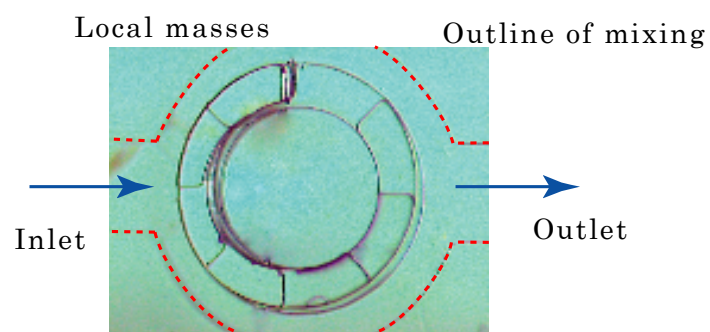
PDMS 製マイクロミキサを作製したソフトマイクロマシンプロセスを図 3-17(a)-(f)に示す。図 3-17(a)に示すように、ネガティブフォトリジスト SU8-3050 をシリコンウェハ上に $50\mu\text{m}$ の厚さにスピンコートし、紫外線露光により硬化させ、流路パターンの鋳型を作製した。次に、質量分布構造を有する流路上壁側の鋳型とするため、ネガティブフォトリジスト SU8-3010 をシリコンウェハ上に $10\mu\text{m}$ の厚さにスピンコートし、最終的に作製する質量分布部の厚みが $10\mu\text{m}$ から $10\mu\text{m}$ ピッチで $80\mu\text{m}$ まで 8 段階にリング形状（外径： $800\mu\text{m}$ ，内径： $500\mu\text{m}$ ）に分布するように、ネガレジスト SU8-3010 の塗布と 3-18(a)-(h)に示すフォトマスクを円周上に移動しながらの露光を繰り返した。多重露光と移動マスクの方法を組み合わせることで厚さ分布を有する鋳型を作製した。そして、図 3-17(a)のように作製した流路パターン鋳型と図 3-17(b)のように作製した 8 段階の厚みを有する鋳型を図 3-17(c)に示すようにガラススペーサを介して向かい合わせ、液状の PDMS を流し込み、 90°C に 20 分間加熱して硬化させた。PDMS の硬化後、図 3-17(d)に示すように流路パターン鋳型を取り外し、取り外した面の PDMS に酸素プラズマ処理を施した後、図 3-17(e)に示すようにガラス板を貼り合わせた。最後に、図 3-17(f)に示すように厚み分布を有する鋳型を取り外し、8 段階の板厚を有するマイクロミキサを作製した。



(a) Overall view

(b) Upper wall

(c) SEM image of upper wall



(d) Photograph of mixing chamber

図3-16 作製したマイクロミキサ

Fig.3-16 The fabricated micromixer and experimental setup

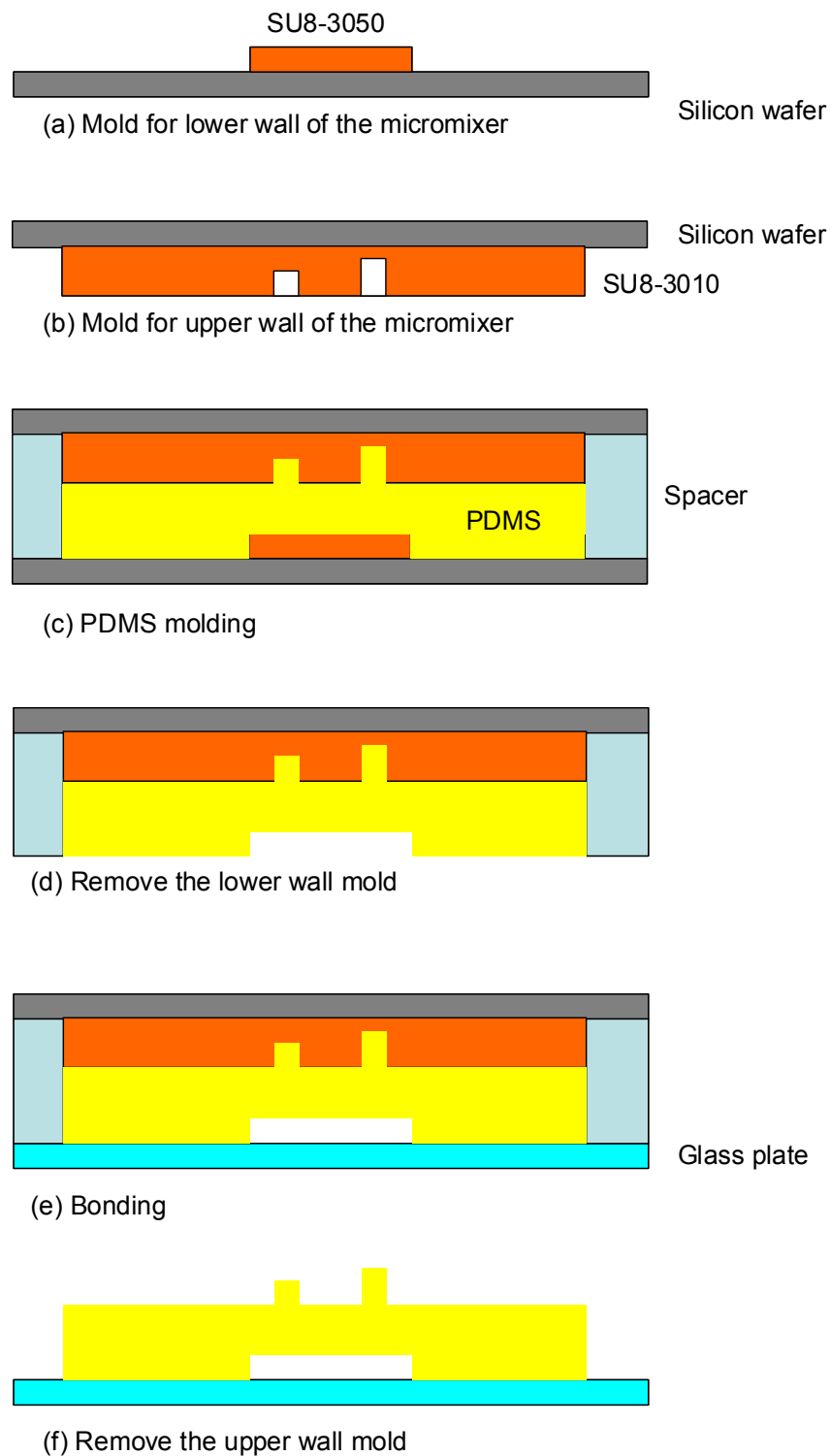


図3-17 質量分布マイクロミキサの作製手順
 Fig .3-17 Fabrication procedures

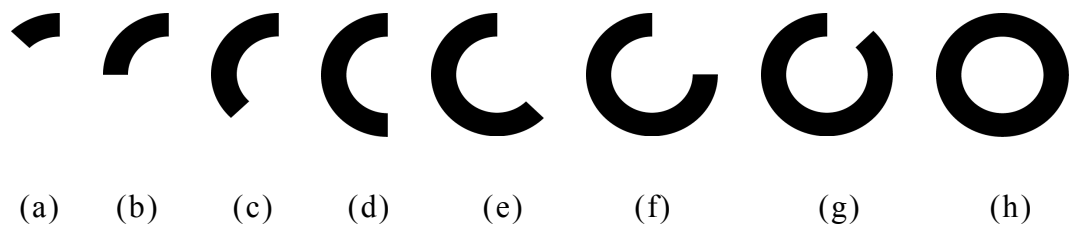


図3-18 マイクロミキサ上壁部の鋳型作製に用いたフォトマスク

Fig .3-18 Photomasks for the mold of micromixer's upper wall

3.2.4 ドップラー振動計による振幅分布測定

圧電カンチレバーを用い、作製したマイクロミキサの厚みを $210\mu\text{m}$ から $290\mu\text{m}$ まで段階的に分布させた上壁部中心から加振した。このときの、上壁部裏側（流路側）の平面の変形をドップラー振動変位計を用いて計測した結果を図 3-19(a)-(c)に示す。

各図中の橙色の領域と濃青色の領域は、図 3-15 に示すように円板の中心で直交する軸からの回転角 θ と中心からの距離 r を取り、凸側の最大変位位置と凹側の最大変位位置を示している。加振周波数が 1250Hz の場合には、図 3-19(a)に示す様に $(r, \theta)=(320\mu\text{m}, 335^\circ)$ の位置において最大凸変位は $0.18\mu\text{m}$ となり、 $(r, \theta)=(320\mu\text{m}, 88^\circ)$ の位置において最大凹変位は $-3.35\mu\text{m}$ となっている。加振周波数を 1500Hz （図 3-19 (b)）、 1875Hz （図 3-19 (c)）と上げていくことにより、最大凸変位の位置は $(r, \theta)=(320\mu\text{m}, 220^\circ)$ から $(r, \theta)=(320\mu\text{m}, 110^\circ)$ の位置まで周波数に依存して移動するとともに、変位量も $0.24\mu\text{m}$ から $0.31\mu\text{m}$ まで増加している。一方最大凹変位を生じる位置は $(r, \theta)=(370\mu\text{m}, 325^\circ)$ の位置から $(r, \theta)=(400\mu\text{m}, 65^\circ)$ の位置まで移動し、変位量は $-6.32\mu\text{m}$ から $-1.92\mu\text{m}$ に変化した。半径方向の移動は板厚の分布に依存していると考えられる。これらの結果から、周波数を変化させることにより、最大変位の位置は円周方向に移動させることができると言

え、これは、本論文で提案した厚み分布を与えることにより周波数に依存した最大変位点の移動が実現出来ていることを示している。最大変位量が周波数により異なるのは、加振エネルギーは振動周波数と振幅の積であることから、入力エネルギーを同じにした場合、振動周波数の違いにより振幅が変化するためであるが、周波数の変化が 400Hz 程度と小さいことから、大きく送液に影響しないと考える。有限要素法解析による共振周波数が 1840-2390Hz であるのに対して実験結果は 1250Hz-1876Hz であった。これは、計算に用いた PDMS の材料定数が作製した PDMS と異なること、さらに空気の抵抗により周波数が下がったと考えられる。

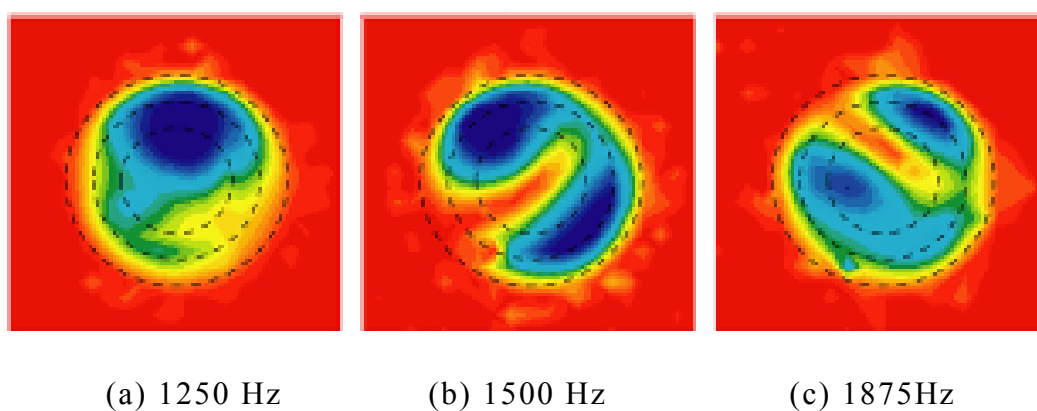


図 3-19 ドップラー振動計による加振振動数別の振幅分布測定結果

Fig.3-19 Amplitude mapping measured using a Dopplar vibrometer

3.2.5 蛍光粒子を用いた流れの可視化と混合率測定

作製したマイクロミキサに圧電カンチレバーを用いて周波数を変えながら加振することによって混合がどの程度促進されるかを評価するため、蒸留水と蛍光粒子溶液を液体試料として用いた実験を行った。

実験系の概略図を図 3-20 に示す。マイクロミキサの T 字形状のマイクロ流路の一端から蒸留水を、他端から蛍光粒子溶液(ウラニン)をそれぞれシリンジポンプによって流速 $1\mu\text{L}/\text{min}$ でそれぞれ送液し、T 字流路の合流点から $500\mu\text{m}$ 下流にある質量分布構造を有する混合チャンバの上壁部中心に圧電カンチレバーが接触するように固定し、圧電カンチレバーに $0\text{-}40\text{V}$ の入力電圧を周波数範囲 $1300\text{-}1800\text{Hz}$ で周波数掃引周期を 1 秒として加えた。加振時における混合チャンバ及び混合チャンバから $500\mu\text{m}$ 下流のマイクロ流路の蛍光画像を顕微鏡に取り付けた CCD カメラで撮影し、撮影画像の蛍光輝度分布から混合度を評価した。

図 3-21(a)-(j)に混合チャンバ内の典型的な流れの様子を示す。図 3-21(a)は加振直前の画像であり、図 3-21(b)-(j)は加振開始後 0.1-0.9 秒までの 0.1 秒毎の画像であり、これは、 $1350\text{-}1750\text{Hz}$ の範囲で 50Hz 毎に異なる周波数で加振した場合の結果に対応する。

加振直前の図 3-21(a)および加振開始 0.1 秒後で周波数 1350Hz の図 3-21(b)では、渦が生成していないが、加振開始 0.2 秒後で周波数 1400Hz の図 3-21(c)から混合チャンバ中心を中心とする右回りの渦が生成し始め、加振開始 0.3 秒後で周波数 1450Hz の図 3-21(d)から加振開始 0.4 秒後で周波数 1500Hz の図 3-21(e)まで右回りの渦が加速、続いて、加振開始 0.5 秒後で周波数 1550Hz の図 3-21(f)から加振開始 0.6 秒後で周波数 1600Hz の図 3-21(g)まで渦が減速、更に、加振開始 0.7 秒後で周波数 1650Hz の図 3-21(h)で渦が再び加速し、加振開始 0.8 秒後で周波数 1700Hz の図 3-21(i)で渦が再び減速し、最後に、加振開始 0.9 秒後で周波数 1750Hz の図 3-21(j)で渦が生成しなくなっている。このように、周波数を掃引しながらマイクロミキサを加振することにより、 $1400\text{Hz}\text{-}1700\text{Hz}$ の間でマイクロミキサの混合チャンバ内に加減速を繰り返す渦を生成させることが可能であることが分かった。

次に、加振による混合促進の程度を評価するため、加振しない場合

（以下、加振なしと記載する）と固定周波数を加振した混合（以下、固定周波数加振と記載する）、周波数を掃引しながら加振（以下、周波数掃引加振と記載する）した混合の混合チャンバから 500 μm 下流のマイクロ流路の蛍光観察を行った。混合度合いの指標としては、式(9)で表されるミキシングインデックス^[16]値を用いた。

$$I(y) = 1 - \frac{1}{\langle C \rangle} \sqrt{\frac{\sum_x (C(x) - \langle C \rangle)^2}{N}} \quad (9)$$

式中、 x は流路と垂直に取った座標、 $C(x)$ は点 x における蛍光輝度、 $\langle C \rangle$ は $C(x)$ の平均値、 N は蛍光輝度の測定点数、 y は流路と平行に取った座標、 $I(y)$; y 点におけるミキシングインデックスをそれぞれ表す。完全に均一な混合のとき、 $I(y)$ は 1 となり、 $I(y)$ 1 から 0 に近づくほど、測定点ごとの蛍光輝度にバラツキが大きく、混合がより不十分であることを示す。図 3-22 に示す蛍光顕微鏡画像から $I(y)$ を測定したところ、それぞれ加振なし 0.31, , 固定周波数加振 0.49, , 周波数掃引加振 0.92 と固定周波数加振は加振なしよりも 0.18 大きい値を示し、周波数掃引加振では、加振無しよりも 0.61 大きく固定周波数加振よりも 0.43 大きい値であった。

これらの結果から、本研究において提案した質量分布構造と周波数掃引加振が混合を促進させることが明らかとなった。比較のため、混合チャンバ上壁部が突起を有さない円板のみのマイクロミキサを作製し、周波数掃引加振の際の混合度を測定したところ、ミキシングインデックスの値は 0.41 であり、質量分布構造を有する場合の固定周波数加振よりもさらに 0.08 小さい値を示し、効果的な混合の促進に質量分布構造が有効であることが分かった。突起による質量分布構造がマイクロミキサの混合チャンバ内に渦を生成させ、混合を促進していると言える。

マイクロミキサを用いて蒸留水と蛍光粒子溶液を混合した実験の結果、ミキシングインデックスが 0.92 であった。一方、微小磁性粒子をチャンバー内に挿入して外部磁界を用いて蒸留水と血液を混合した実験では、15 回の繰り返し実験の再現性が、変動係数で 0.18% であった。

ミキシングインデックスと変動係数を直接比較することはできないが、15回の測定結果がそれぞれミキシングインデックスを算出するのに用いた蛍光強度 $C(x)$ に相当すると仮定して測定結果を代入すれば、微小磁性粒子を用いた混合のミキシングインデックスは、式(9)の $\langle C \rangle$ に 0.8857, N に 15, $C(x)$ に 0.8905, 0.8809, 0.8863, 0.8881, 0.8863, 0.8867, 0.8839, 0.8790, 0.8861, 0.8869, 0.8867, 0.8863, 0.8861, 0.8858, 0.8860 を代入することにより 0.9970 と計算できる。

$$I(y) = 1 - \frac{1}{\langle C \rangle} \sqrt{\frac{\sum_x (C(x) - \langle C \rangle)^2}{N}} \quad (9)$$

本研究で提案した質量分布構造によるマイクロミキサが、微小磁性粒子を用いたミキサに混合性能が低いことは、混合チャンバに生じている渦が、微小粒子を混合チャンバで回転させる際に生じる渦よりも速度が遅いためであると考えられる。本研究では、質量分布を階段状に厚みの異なる構造としたが、例えばグレイマスクを用いる方法によって連続的に厚みの変化するスロープ構造を作製することで周波数の掃引に連続的に応答する構造も効果的であると考えられる。

本研究で提案したマイクロミキサを血液検査デバイスに応用する場合、周波数掃引加振の手法は、マイクロミキサ生産のばらつきによって個々の共振周波数が変化しても、そのばらつきが周波数掃引の範囲内に入っていれば同様の混合効果が期待できるため、特定の周波数において共振する形状の混合チャンバを厳密に作製する必要がなく、ある程度の寸法公差が許されるため、製造コストを抑えることができると考えられる。このことから、周波数を掃引させながら加振して使用する質量分布型マイクロミキサは、製造コストを抑えつつ、混合を促進させる性能を有し、使い捨て型血液検査チップに適したマイクロミキサになり得ると考えられる。

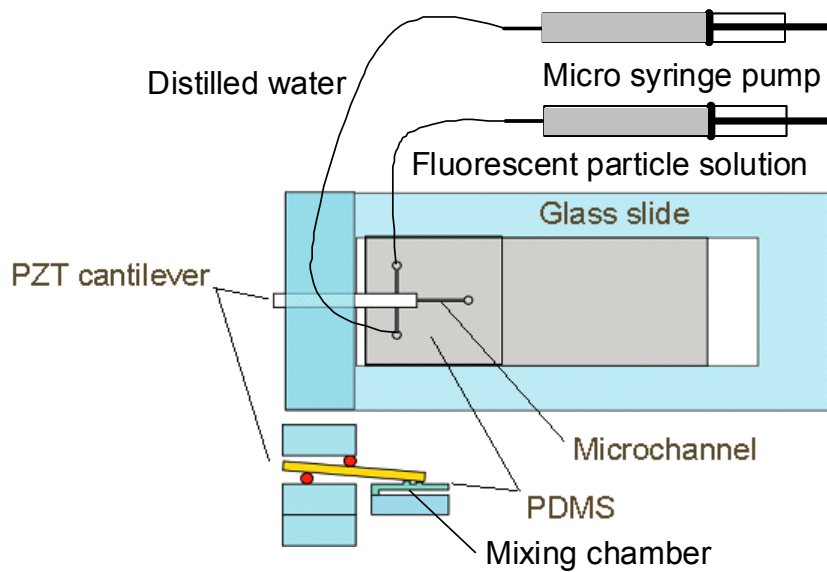
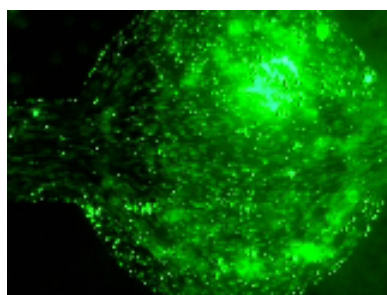
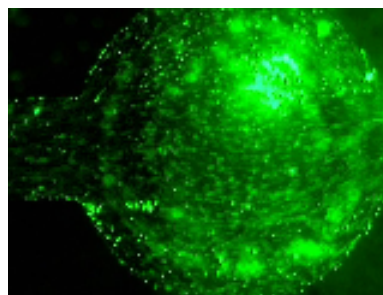


図3-20 混合性能評価実験の概略図

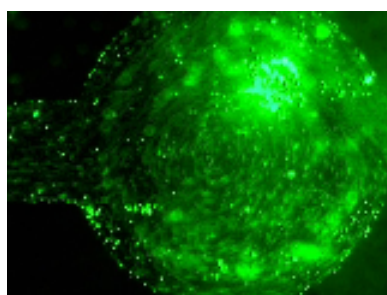
Fig.3-20 Experimental setup for mixing performance



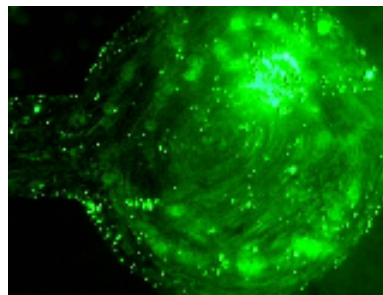
(a) 1350Hz



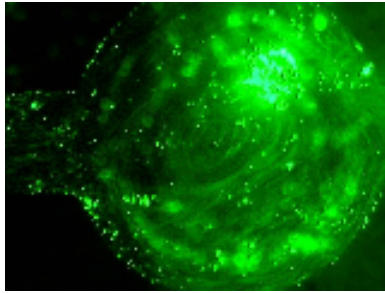
(b) 1400Hz



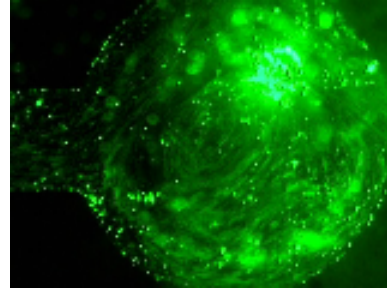
(c) 1450Hz



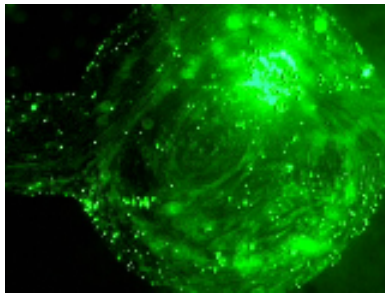
(d) 1500Hz



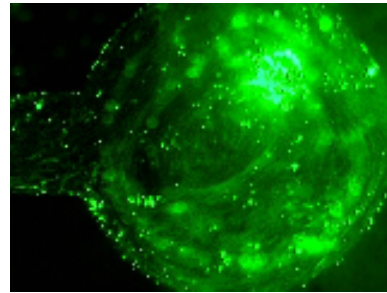
(e) 1550Hz



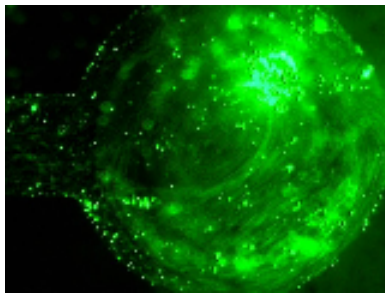
(f) 1600Hz



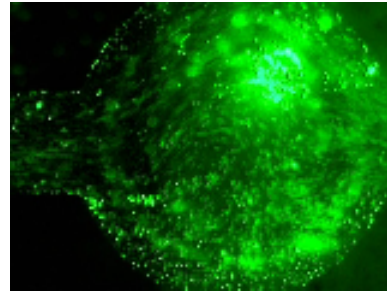
(g) 1650Hz



(h) 1700Hz

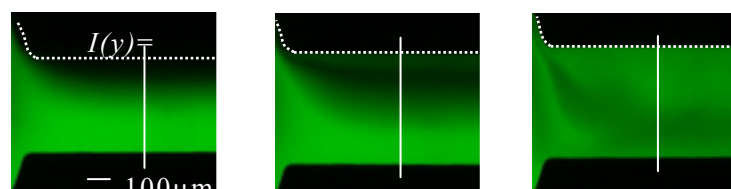


(i) 1750Hz



(j) 1800Hz

図 3-21 周波数スキャン加振時の混合チャンバ内の流れ
Fig.3-21 Flow pattern inside microchamber during frequency sweep



(a) Diffusion only (b) Fixed frequency (c) Frequency sweep

図 3-22 周波数スキャンによる混合促進の効果

Fig.3-22 Mixing Efficiency of fluorescent solution and water flown at
constant flow rate of 1 $\mu\text{L}/\text{min}$

3.3 結言

質量分布構造を周波数掃引加振する液体駆動方法を提案し、これをマイクロミキサに応用した。作製した PDMS 製のマイクロミキサに圧電カンチレバーを用いて加振し、マイクロミキサの混合チャンバ壁の振動をドップラー振動変位計で測定することにより、加振周波数を変化させることによって、円板の(1,0)モードと分布質量の局所共振モードの連成が生じてその最大振幅位置が周波数に応じて変化することが分かった。また、作製したマイクロミキサを用いた蒸留水と蛍光粒子の混合評価実験により、式(9)で定義されるミキシングインデックスが 0.92 を示す混合性能であることが示され、質量分布構造と周波数掃引加振によってマイクロ流路内の試料に流れを生じさせる手法が混合を促進させる機能を有することを示した。

本研究の液体駆動方法は、流体の挙動を制御することが可能なことから、マイクロミキサ以外に、マイクロポンプ等へも応用可能である。

参考文献

- [1] A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone, G. M. Whitesides, Chaotic mixer for microchannels, *Science* 295 (2002) 647-651.
- [2] V. Hessel, H. Lowe, F. Schonfeld, Micromixers - a review on passive and active mixing principles, *Chemical Engineering Science* 60 (2005) 2479-2501.
- [3] N. T. Nguyen, Z. Wu, Micromixers- a review, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 15 (2005) R1-R16.
- [4] S. H. Wong, M. C. L. Ward, C. W. Wharton, Micor T-mixer as a rapid mixing micromixer, *Sensors and Actuators B Chemical* 100 (2004) 359-379.
- [5] D. Bothe, C. Stemich, H. J. Warnecke, Fluid mixing in a T-shaped micro-mixer, *Chemical Engineering Science* 61 (2006) 2950-2958.
- [6] M. Hoffmann, M. Schluter, N. Rabiger, Experimental investigation of liquid-liquid mixing in T-shaped micro-mixers using μ -LIF and μ -PIV, *Chemical Engineering Science* 61 (2006) 2968-2976.
- [7] F. Schonfeld, V. Hessel, C. Hofmann, An optimised split-and-recombine mixer with uniform chaotic mixing, *Lab on a Chip* 4 (2004) 65-69.
- [8] A. A. S. Bhagat, E. T. K. Peterson, I. Papautsky, A passive planar micromixer with obstructions for mixing at low Reynolds numbers, *Journal of micromechanics and microengineering* 17 (2007) 1017-1024.
- [9] H. Wang, P. Iovenitti, E. Harvey, S. Masood, Optimizing layout of obstacles for enhanced mixing in microchannels, *Smart materials & structures* 11 (2002) 662-667.
- [10] L. Chen, G. Wang, C. Lim, G. H. Seong, J. Choo, E. K. Lee, S. H. Kang, J. M. Song, Evaluation of passive mixing behaviors in a pillar obstruction poly(dimethylsiloxane) microfluidic mixer using fluorescence microscopy, *Microfluid Nanofluid* 7 (2009) 267-273.

- [11] Y. C. Lin, Y. C. Chung, C. Y. Wu, Mixing enhancement of the passive microfluidic mixer with J-shaped baffles in the tee channel, *Biomedical Microdevices* 9 (2007) 215-221.
- [12] P. B. Howell, Jr., D. R. Mott, S. Fertig, C. R. Kaplan, J. P. Golden, E. S. Oran, F. S. Ligler, A microfluidic mixer with grooves placed on the top and bottom of the channel, *Lab on a Chip* 5 (2005) 524-530.
- [13] J. F. Wang, Y. Liu, Y. S. Xu, The golden-mean surface pattern to enhance flow mixing in micro-channel, *Bio medical Microdevices* 11 (2009) 351-357.
- [14] S. Jayaraj, S. Kang, Y. K. Suh, A review on the analysis and experiment of fluid flow and mixing in micro-channels, *Journal of Mechanical Science and Technology* 21(2007) 536-48.
- [15] H. A. Stone, A. D. Strook, A. Ajdari, Engineering flows in small devices: Microfluidics toward a Lab-on-a-Chip, *Annual review of fluid mechanics* 36 (2004) 381-411.
- [16] H. J. Sheen, C. J. Hsu, T. H. Wu, H. C. Chu, C. C. Chang, U. Lei, Experimental study of flow characteristics and mixing performance in a PZT self-pumping micromixer, *Sensors and Actuators A Physical* 139 (2007) 237-244.
- [17] Z. Yang, M. Matsumoto, H. Goto, M. Matsumoto, R. Maeda, Ultrasonic micromixer for microfluidic systems, *Sensors and Actuators A Physical* 93 (2001) 266-272.
- [18] Z. Yang, H. Goto, M. Matsumoto, R. Maeda, Active micromixer for microfluidic systems using lead-zirconate-titanate(PZT)-generated ultrasonic vibration, *Electrophoresis* 21 (2000) 116-119.
- [19] B. R. Lutz, J. Chen, D. T. Schwartz., Microfluidics without microfabrication, *PNAS*, 100(8) (2003) 4395-4398.
- [20] S. Oberti, A. Neild, T. W. Ng, Microfluidic mixing under low frequency vibration, *Lab on a chip*, 9 (2009) 1435-1438.

- [21] N. Sundaram, D. K. Tafti, Evaluation of microchamber geometries and surface conditions for electrokinetic driven mixing, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3785-3793.
- [22] Mark J., *Polymer Data Handbook*, Oxford Univ. Press New York (1999)

第4章 タンパク質吸着抑制表面処理

4.1 緒言

小規模な開業医やクリニック等において行われる POCT(Point of Care Testing)検査に用いられる血液検査用デバイスは、取り扱いの簡便性、実用的なコストとともに、血液の付着した使用済みデバイスを介して検査者に感染する危険性を防止するために、使い捨てであることが望まれている。使い捨てデバイスのコストを抑えるため、血液検査用デバイスの材料として安価な樹脂材料を用いるのが一般的である。本研究の目的である血球計数用 μ TAS デバイスにおいても、使い捨てを考慮し、デバイス材料は樹脂材料を用いなくてはならない。しかし、樹脂材料の表面にはタンパク質が吸着しやすいことが知られており^[1]、血液には、アルブミン、 γ -グロブリン、フィブリノーゲン等のタンパク質が含まれる^[2]ため、タンパク質の吸着によるデバイス性能への悪影響を防止するためのタンパク質吸着抑制が必要である^{[3][4]}。特に本研究の目的である血球計数デバイスにおいては、血球がデバイスのマイクロ流路へ吸着することによって試料溶液に含まれる血球数が減少し、計数結果に負誤差を生じさせるという影響を生じるため、マイクロ流路表面へのタンパク質の吸着を抑制することが重要である。

樹脂材料の表面にタンパク質が吸着しやすいのは、タンパク質がその分子構造中に疎水基を有し、樹脂材料表面のメチル基等の疎水基と疎水結合するためである^[1]。従って、樹脂表面の疎水基を被覆する表面処理によってタンパク質の吸着を抑制できると考えられ、近年、表面処理剤として、2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (以下 MPC) ポリマーが盛んに用いられている^[5]。図 4-1 に MPC ポリマーの分子構造を示す。MPC ポリマーは、メタクリル骨格の側鎖にリン脂質親水基を持つメタクリル系ポリマーであり、樹脂材料表面にコーティングすることによって樹脂材料表面の疎水基を被覆しながらリン脂質親水基を表面に並べ、タンパク質との疎水結合を抑制することができる。MPC ポリマーは、 μ TAS デバイスの表面処理剤^{[6][7]}のみならず、人工透析フィルタ材料^[8]、人工関節材料^[9]など生体試料と接触する材料の表面処

理剤として盛んに研究されている。このように MPC ポリマーはタンパク質の吸着抑制に優れた材料であるが、未だ研究段階で一般的に大量に消費されていないため、非常に高価であるという問題がある。

一方、安価な表面処理剤として、ポリオキシエチレン基を含むポリマー、特にポリエチレングリコール類が知られている^[1]。Lee ら^[10]は、コロナ放電処理を行ったポリエチレン基板をポリエチレングリコールモノマーの溶液に浸漬した後、80℃の環境に 4 時間置くことによって表面処理を行い、血漿タンパクと血小板の吸着量が減少することを報告している。また、Farrell ら^[11]はプラズマ処理によって活性化させた PDMS 基板を用いてポリエチレングリコールの表面処理を行っており、Papra ら^[12]は、塩酸溶液に浸漬することによって材料表面を活性化し、トリメトキシシランポリエチレングリコールの塩酸溶液を用いた PDMS 基板の表面処理を報告している。また、Yu ら^[13]は、PDMS 基板に浸透するクロロホルムを溶媒としたポリエチレングリコール／クロロホルム溶液を用いて PDMS 表面を活性化し、PDMS 基板への表面処理を行っている。このように、ポリエチレングリコール類を用いて樹脂材料を表面処理するためには、コロナ放電や酸や有機溶媒を用いて材料を活性化する前処理が必要であり、単純な水溶液を用いて簡易に表面処理を行うことができない。前処理を必要とする表面処理を POCT デバイスの作製に用いると生産工程が複雑となり、デバイスの製造コストが高くなるという問題も生じる。そこで、Bi ら^[14]、および、Xiao^[15]らは、樹脂表面の疎水基と疎水結合できる疎水基を分子構造に含むポリエチレングリコールを表面処理剤として用い、ポリエチレングリコール水溶液のみを用いてアクリル樹脂基板および PDMS 基板の表面処理を行っている。また、Wu ら^[16]は、疎水基としてポリプロピレンオキサイド基を有し、かつポリエチレングリコールと同じポリエチレンオキサイド鎖を有するプルロニック（商品名）を表面処理剤として用い、PDMS 基板への表面処理を行っている。この他、Shi ら^[17]は、ポリエーテルスルホンの表面処理剤としてプルロニックを利用し、Amiji ら^[18]は、低密度ポリカーボネートにプルロニックを表面処理することによってタンパク質の吸着が抑制できることを報告している。これらの研究では、種々のプルロニックの中でも、疎水基と親水基の比率に

において、親水基の比率が高い分子構造のものが用いられているが、表面処理水溶液に樹脂材料を浸漬する時間が 1-24 時間必要であり、表面処理時間が長いという課題がある。

本研究では、タンパク質の吸着を抑制する表面処理を処理時間 10 分で可能とするための表面処理剤として疎水基比率の高いプルロニックを用い、表面処理したポリスチレンに対するタンパク質の吸着を実験により評価するとともに、表面処理剤の分子構造とタンパク質抑制効果との関係について考察する。

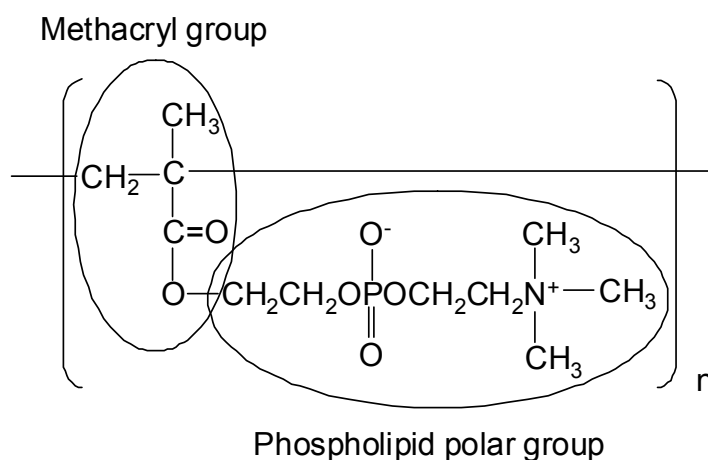


図 4-1 MPC ポリマーの分子構造

Fig.4-1 Molecular structure of MPC polymer

4.2 タンパク質吸着抑制の原理

4.2.1 プルロニックの分子構造

プルロニックは、洗浄力，乳化，可溶化，分散力に優れ、酸，アルカリ，過酸化物，金属イオン等に対して安定であり、無毒性，無色，無味，無臭，無刺激性、消泡性がある等の優れた特性を有する界面活性剤である。近年では、洗浄後も樹脂材料の表面に残留する特性から、ソフトコンタクトレンズの潤い（親水性）を保つための成分としてソフトコンタクトレンズ用の保存液や洗浄剤等に利用されている^[19]。プルロニックの分子構造は、図 4-2 に示すように親水性の官能基であるエチレンオキシド基（以下 EO 基；Ethylene Oxide）と疎水基であるプロピレンオキシド基（以下 PO 基；Propylene Oxide）が、m 個の EO 基、n 個の PO 基、m 個の EO 基と交互に直列に並んだ構造である。EO 基、PO 基の数の組合せにより特性に違いが生じるため、EO 基、PO 基の数の組合せが異なる多くの種類の製品が存在し、それらが用途に応じて使い分けられている。

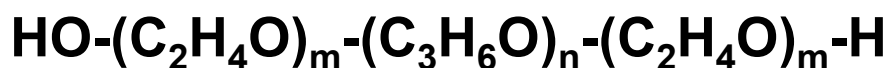


図 4-2 プルロニック分子構造

Fig.4-2 Molecular structure of Pluronic

4.2.2 プルロニックのタンパク質吸着抑制原理

水溶液中のタンパク質の樹脂表面への吸着は、図 4-3 に模式的に示すように、以下の二段階の現象によるものと考えられている^[1]。

第 1 段階

タンパク質が樹脂表面へ接近する段階

第 2 段階

樹脂表面に接近したタンパク質の疎水基が樹脂表面の疎水基と疎水結合する段階

上述のように、樹脂表面の疎水基がタンパク質吸着の原因であると考えられることから、樹脂表面に親水基を載せて疎水基を被覆することにより、タンパク質の吸着を抑制できると考えられる。プルロニックを用いた表面処理では、図 4-4 に示すようにプルロニック中の疎水基である PO 基とポリスチレン表面のメチル基等の疎水基とが疎水結合することにより材料表面にプルロニックが固定化され、親水基である EO 基が材料表面の疎水基を被覆しながら表面を向く。このことにより、タンパク質と材料表面の疎水結合を阻害することができると考えられる。更に、一定以上の鎖長を有する EO 基が表面に存在すると、EO 基が立体障害となり、タンパク質の樹脂表面への接近を阻害するという効果も報告されている^[1]。これら 2 つの効果により、タンパク質の吸着が抑制されることが考えられる。

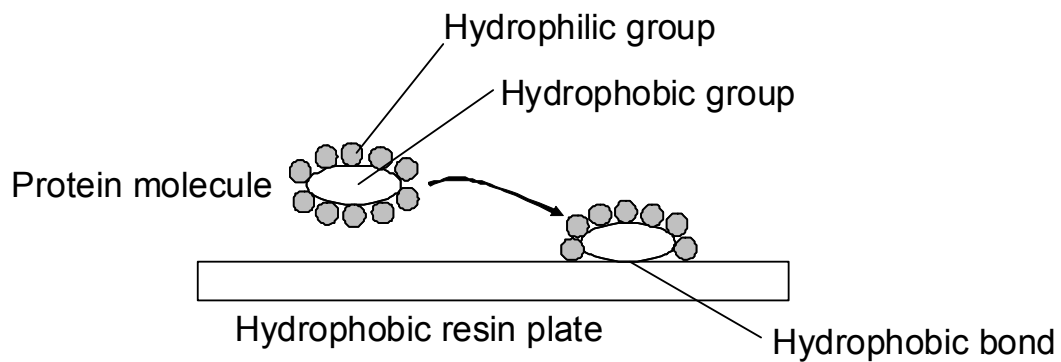


図 4-3 タンパク質分子の疎水性プラスチック表面への吸着
 Fig.4-3 Adsorption of protein molecule on hydrophobic resin's surface

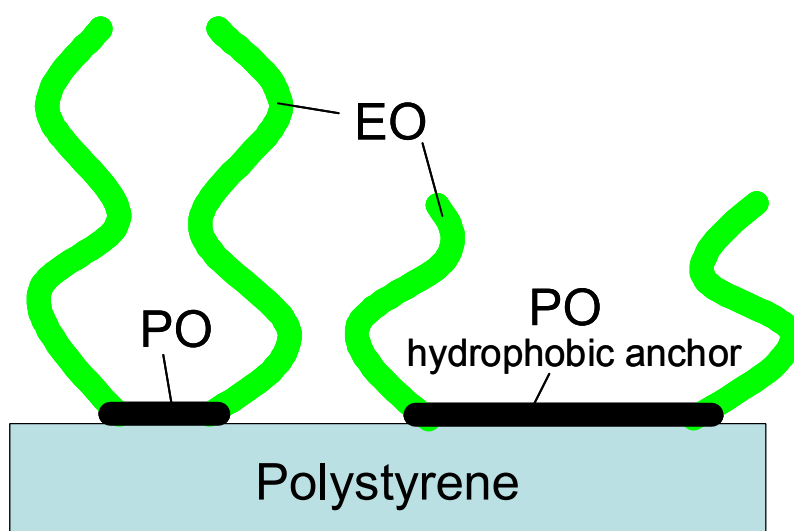


図 4-4 プルロニック表面処理の概念図
 Fig.4-4 Schematic depiction of Surface modification

4.3 表面処理方法

4.3.1 樹脂基板および表面処理剤

従来の研究では、疎水基である PO 基比率が 20%程度のプルロニックが用いられているが、表面処理水溶液に樹脂材料を浸漬する時間が 1-24 時間必要であり、表面処理時間が長いという課題があった。表面処理時間が長い原因として、PO 基比率が低いためにプルロニック分子と樹脂表面の間の疎水結合の生成に時間を要することが考えられる。そこで、本研究では、表面処理時間を短縮させるため、PO 基比率が 60～90%と高い型番のプルロニックを選択し、表面処理液に樹脂材料を浸漬する時間を 10 分にして表面処理を行った。また、比較のため、PO 基比率が 20%程度のプルロニックを用い、同様に短時間の表面処理を行った。

表 4-1 に本研究で用いたプルロニックの型番ごとの EO 基、PO 基数、PO 基の分子量比率、および平均分子量を示す。併せて、図 4-5 にそれぞれの型番の PO 基数および PO 基分子量比率を示す。それぞれの型番の分子構造の詳細は以下の通りである。

型番 F68, F88 および F108 は、疎水基である PO 基の分子量比率が 20%程度と低い従来の研究で用いられていたものである。これらの PO 基数は、それぞれ 30, 38, 56 個である。一方、型番 L64, L101, L121 および P103 は、PO 基分子量比率がそれぞれ 60, 86, 90, 66%と高く、PO 基数が、それぞれ 30, 56, 70, 56 個と型番 F68, F88, F108 と同数または多いものである。

以下の文章では、PO 基比率と PO 基数を明確にするため、例えば、PO 基比率が 21%であり PO 基数が 30 個である型番 F68 を PO(21, 30) のように表記することとする。

表 4-1 プルロニック型番別エチレンオキサイド基,プロピレンオキサイド基数, 平均分子量および本論文での表記

Table.4-1 Number of Ethylene Oxide groups, Propylene Oxide groups, mean molecular weight and signage in this paper

Product No.	Number of EO, PO	PO ratio (%)	Mean molecular weight	Signage
	groups EO / PO / EO			
F68	76 / 30 / 76	21	8400	PO(21, 30)
F88	103 / 39 / 103	20	11000	PO(20, 39)
F108	129 / 56 / 129	22	14500	PO(22, 56)
L64	13 / 30 / 13	60	2900	PO(60, 30)
L101	6 / 56 / 6	86	3800	PO(86, 56)
L121	5 / 70 / 5	90	4500	PO(90, 70)
P103	19 / 56 / 19	66	4900	PO(66, 56)

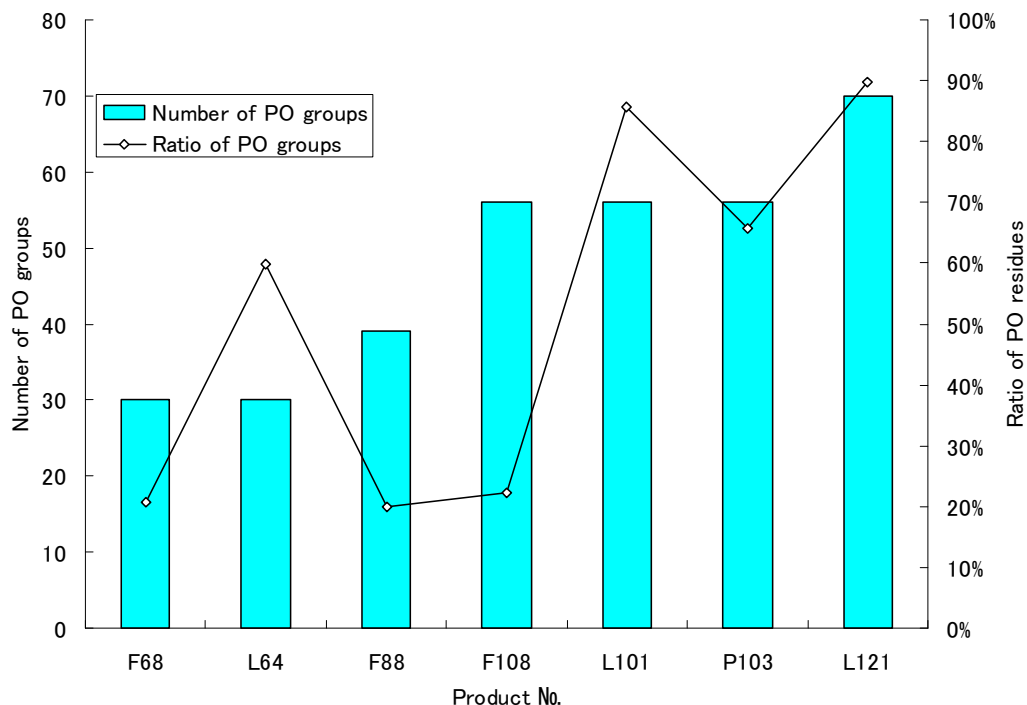


図 4-5 プルロニック型番ごとの PO 数および全分子量に占める PO 比

Fig.4-5 Number and ratio of PO residues

4.3.2 表面処理手順

プルロニック水溶液を用い、巾と深さが共に $200\mu\text{m}$ のマイクロ流路を有する図 4-6 に示すポリスチレン流路の内壁面に対して表面処理を行った。

表面処理手順を図 4-7 に示す。手順の詳細は以下の通りである。

はじめに、図 4-7(a)に示すように、表面処理前の基板を大量の蒸留水で洗浄し、室温環境下で 8 時間以上乾燥した。その後、図 4-7(b)に示すように、ポリスチレン流路成形品に厚さ $100\mu\text{m}$ のポリエチレンテレフタレート製シートに粘着層となる厚さ $50\mu\text{m}$ の PDMS 層が積層された自己粘着カバーシートを貼り付け、マイクロ流路に蓋をした。次に、プルロニックをリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4, 以下 PBS; Phosphate Buffered Saline) に溶解して 0.01, 0.1, 1 wt% の濃度に調製した溶液を図 4-7(c)に示すようにポリスチレン流路成形品のマイクロ流路に流し込み、室温環境下に 10 分間放置した後、ポリスチレン流路成形品に貼り合せてあった自己粘着カバーシートを剥がし、洗ビンを用いて 50mL 以上の蒸留水で十分に洗浄した (図 4-7(d))。その後、ポリスチレン流路成形品を室温環境下で 8 時間以上自然乾燥し、再び新しい自己粘着カバーシートを貼り合わせた。

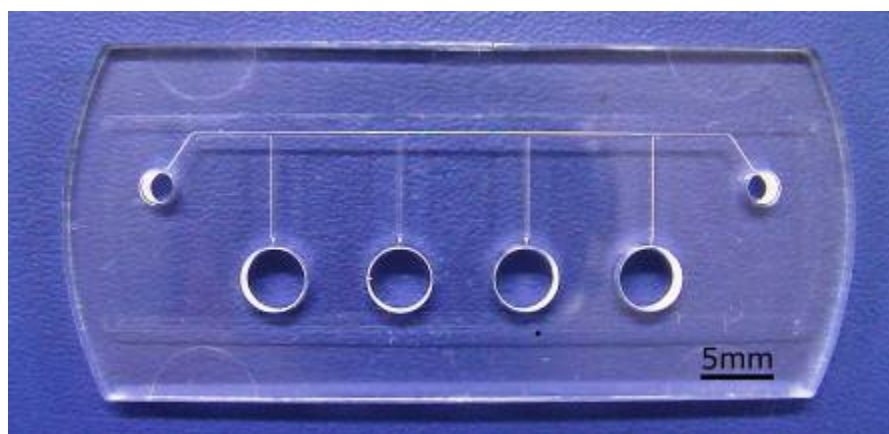


図 4-6 マイクロディスペンサ成形品

Fig.4-6 Photographs of the molded microdispenser

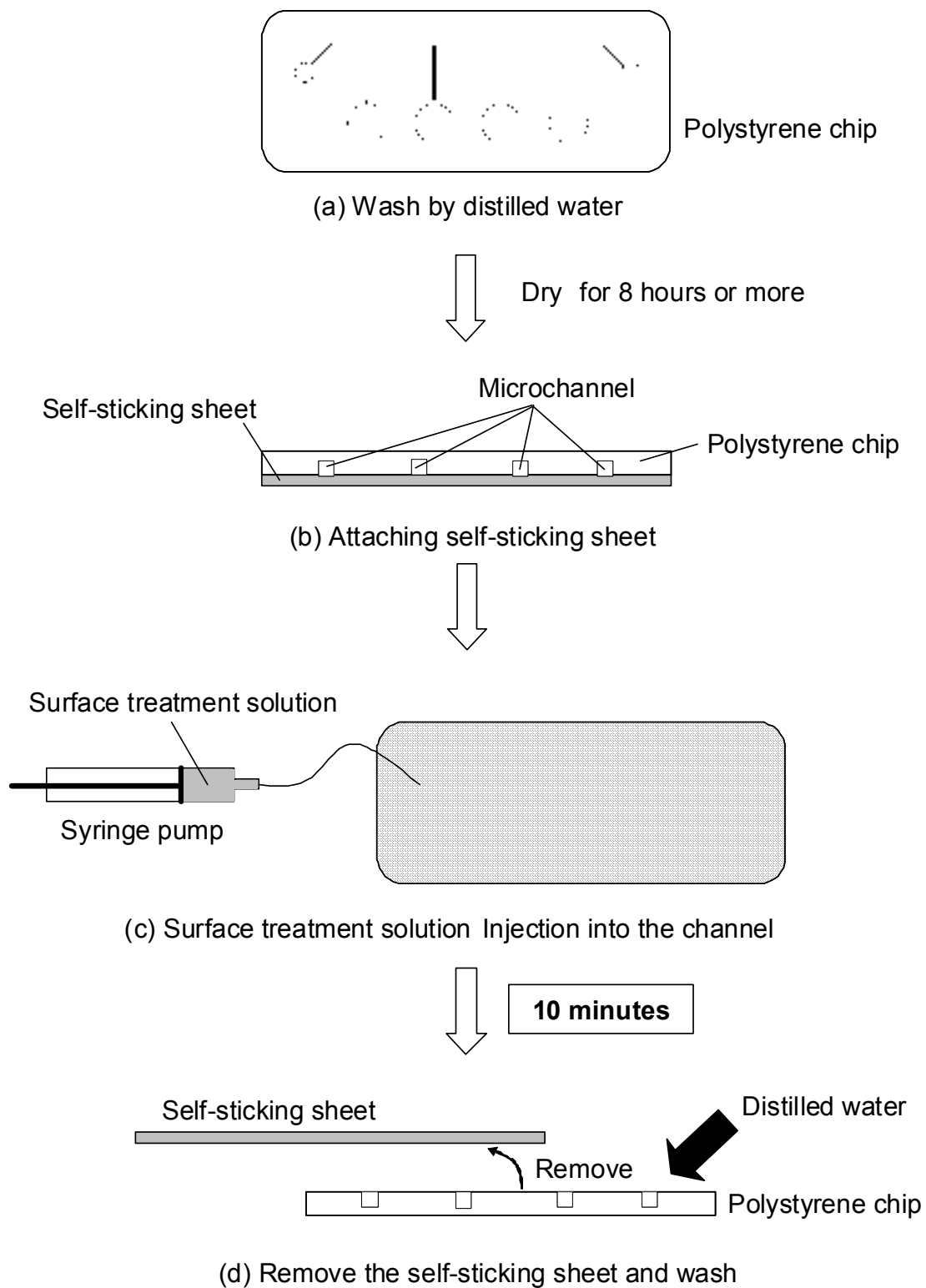


图 4-7 表面处理手順
Fig.4-7 Procedure of surface treatment

4.4 タンパク吸着抑制の評価

表面処理に用いる処理材料の分子構造が流路材料表面における、タンパク質吸着を評価することを目的に以下の 3 つの計測をおこなった。①プルロニックの分子構造と表面処理後のポリスチレン表面に残留するプルロニック分子の多寡の関係を評価することを目的に接触角測定を計測し、さらに、②指先血に含まれるタンパク質の流路壁面への吸着と③蛍光標識抗体を用いたタンパク吸着量の評価を行った。

以下に、3 つの実験方法を示す。

4.4.1 接触角測定

表面処理前後のポリスチレン流路成形品の濡れ性を評価するため、表面処理前後の蒸留水に対する接触角を、接触角計（CA-X, 協和界面科学製）を用いて測定した。

4.3.2 表面処理手順の項では、疎水性で微小なマイクロ流路に気泡を生じてマイクロ流路内壁にプルロニック溶液が接触せず、表面処理が不十分となることを防止するため、マイクロ流路にプルロニック溶液を注入する方法を用いたが、本実験では、接触角測定に用いる表面がマイクロ流路内壁ではなくマイクロ流路成形品の平面部分であることから、図 4-8 に示すように、ポリスチレン流路成形品全体をプルロニック溶液に浸漬する方法を用いた。プルロニック溶液に浸漬した時間は、4.3.2 表面処理手順と同様に 10 分間であり、浸漬後の洗浄方法も 4.3.2 表面処理手順と同様に 50mL 以上の蒸留水で十分に洗浄する方法を用いたため、プルロニック分子がポリスチレン表面と疎水結合する時間は同じであり、結合の弱いプルロニック分子が洗浄によって取り除かれる程度も同じであり、本実験の表面処理方法と 4.3.2 表面処理手順の方法は、同一の効果を有すると言える。

接触角測定は、図 4-9 に示す測定系を用いて行った。まず、ポリスチレン成形品に帯電した静電気によって液滴が変形し、測定誤差が生じることを防ぐため、測定前のポリスチレン成形品を空気イオナイザー（WINSTAT BF-ZC, シシド静電気社）を用いて除電した。次いで、除電したポリスチレン成形品を接触角計のステージに載せ、2 μ L の蒸留水を載せ、表面の液滴を図 4-9 に示す接触角計のカメラで観察するこ

とによって接触角を測定した。

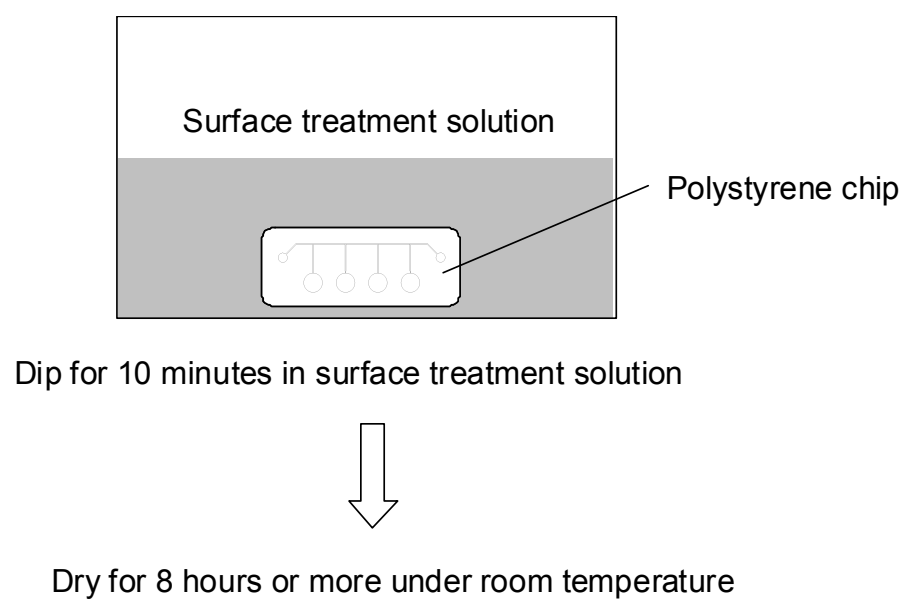


図 4-8 接触角測定のための表面処理手順

Fig.4-8 Procedure of surface treatment before contact angle measurement

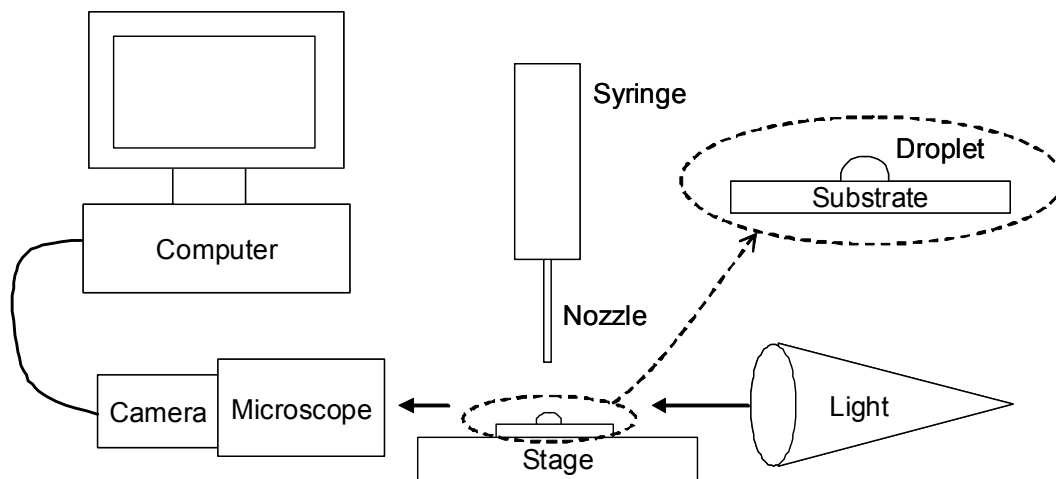


図 4-9 静的接触角の測定装置

Fig.4-9 Experimental setup for static contact angle measurement

4.4.2 指先血を用いた血液吸着評価

タンパク質吸着の抑制を評価するため、表面処理後のポリスチレン流路成形品への血液吸着を評価する実験を行った。

実験手順を図 4-10 に示す。はじめに、自己血糖測定用ランセット（ARKRAY）を用いて指先を穿刺することにより指先から血液を採取し、その血液を表面処理済みのポリスチレン流路成形品のマイクロ流路にシリンジポンプで流した（図 4-10(a)）。そして、図 4-10(b)に示すように蒸発防止のために自己粘着シートをインレット,アウトレットに貼り、15 時間室温環境下に置いた後、自己粘着シートを剥がし、図 4-10(c)に示すように洗びんを用いてマイクロ流路内の全血を 50mL 以上の蒸留水で十分に洗浄し、室温環境下で 8 時間以上自然乾燥した。その後、血液と接触させたマイクロ流路の表面を電子顕微鏡（JSM-5600LV, 日本光電）で観察した。

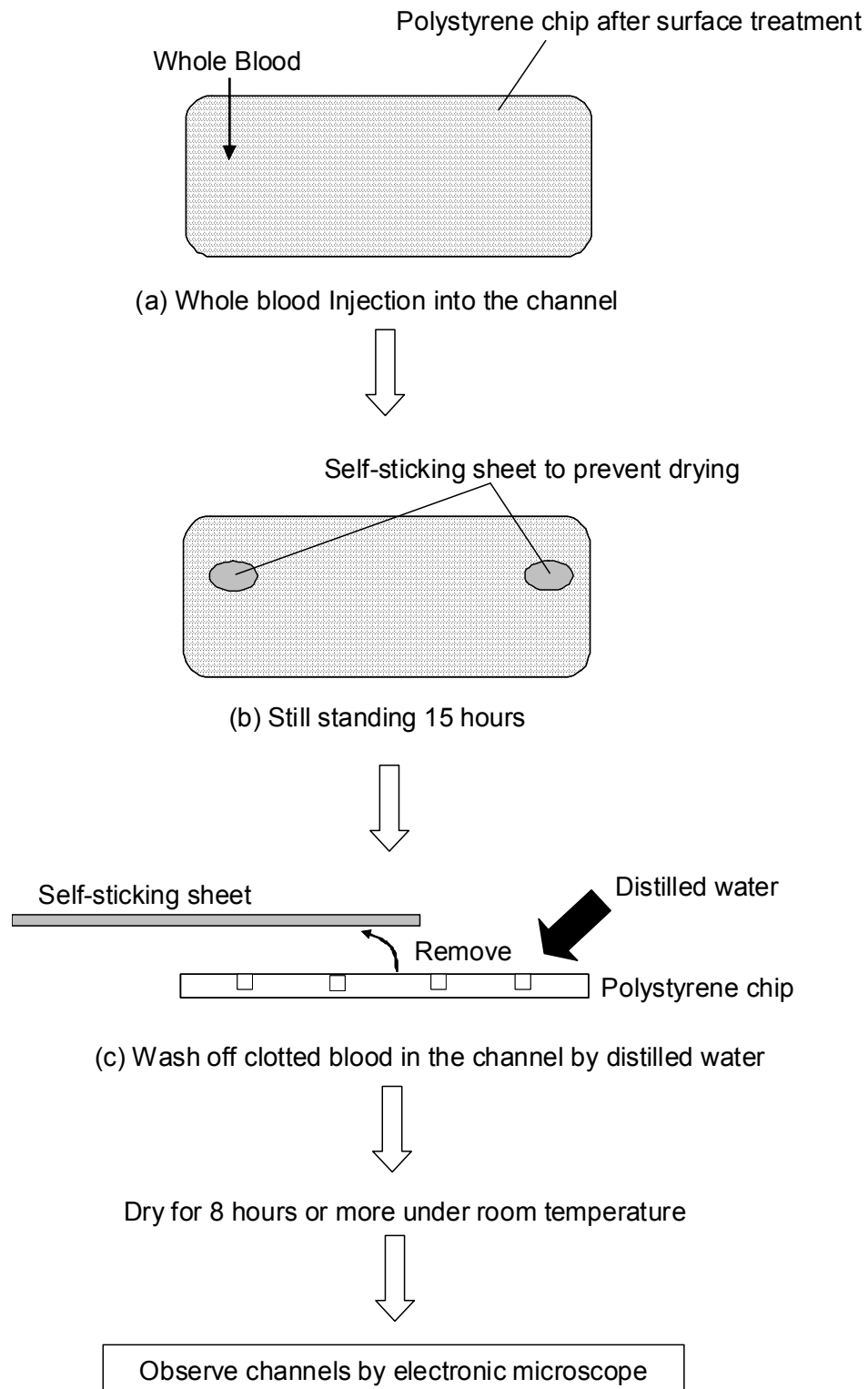


図 4-10 血液吸着評価の実験手順

Fig.4-10 Experimental procedure of blood adsorption

4.4.3 蛍光標識抗体を用いたタンパク吸着量評価

ポリスチレン表面に対するタンパク質吸着を定量的に評価するため、タンパク質試料として蛍光標識した抗体を用い、表面処理剤濃度 0.1% で処理したポリスチレン流路成形品を用いて実験を行った。

実験手順を図 4-11 に示す。図 4-11(a)に示すように蛍光標識抗体 Dylight-IgG (フナコシ製) の 1mg/ml 水溶液を自己粘着カバーシートを貼り付けたポリスチレン流路成形品のマイクロ流路に流し込み、25 度環境下で 18 時間自然乾燥させた。その後、ポリスチレン流路成形品から自己粘着カバーシートを剥がし、図 4-11(b)に示すようにマイクロ流路を 50ml 以上の蒸留水で十分に洗浄し、自然乾燥させた。そして、この洗浄後のポリスチレン流路成形品を蛍光顕微鏡で観察し、一定面積あたりの蛍光強度を測定した。

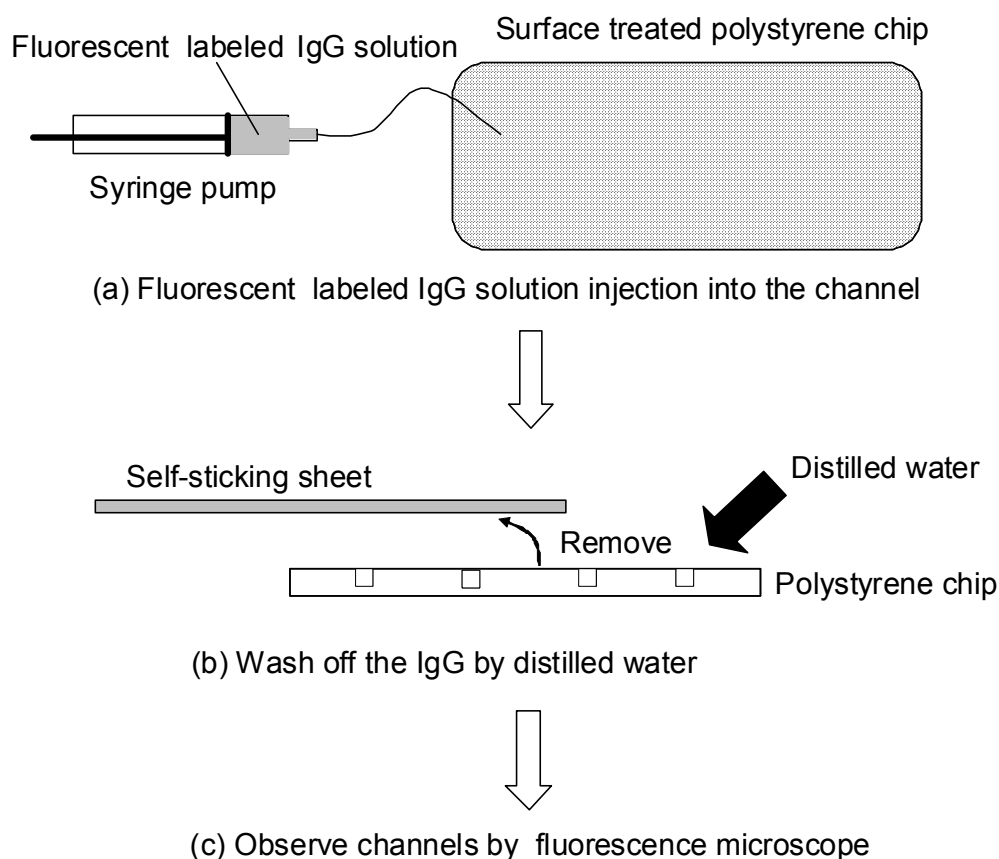


図 4-11 蛍光標識 IgG 吸着評価の実験手順

Fig.4-11 Experimental procedure of fluorescent labeled IgG adsorption

4.5 実験結果および考察

4.5.1 接触角測定

図 4-12(a)に接触角の測定結果を示す。また、図 4-12(c)に表面処理前後の接触角の減少幅を示し、図 4-12(c)に表面処理溶液濃度 0.1%のときの接触角の減少幅を示す。

図 4-12(a)に示すように、表面処理前のポリスチレン流路成形品の接触角は、 88.4° であったが、表面処理後の接触角は表面処理液の濃度が高いほど表面処理前よりも減少し、その減少幅はプルロニックの分子構造によって異なった。

図 4-12(b)に示すように、表面処理後の接触角の減少幅は、PO(21, 30), PO(20, 39)および PO(60, 30)では、濃度が高くなっても接触角の減少が変化せず、その他では、濃度が高いほど減少幅が増大した。表面処理液濃度と減少幅の範囲は、0.01, 0.1, 1.0%においてそれぞれ、 $1.5\text{-}3.7^{\circ}$, $1.1\text{-}6.3^{\circ}$, $1.0\text{-}8.9^{\circ}$ であった。

プルロニックの分子構造による減少幅の相違を見ると、PO(20, 39), PO(21, 30), PO(60, 30)および 0.1%以下の PO(22, 56)では、 $1.0\text{-}2.8^{\circ}$ と減少幅が比較的小さく、PO(66, 56), PO(86, 56), PO(90, 70)および 1.0%の PO(22, 56)では、 $3.2\text{-}8.9^{\circ}$ と比較的大きかった。更にプルロニックの分子構造ごとの減少幅を表面処理液濃度 0.1%に着目して比較すると、図 4-12(c)に示すように PO(20, 39), PO(21, 30), PO(22, 56)および PO(60, 30)で $1.1\text{-}2.8^{\circ}$ の減少幅であるのに対し、PO(66, 56), PO(86, 56), PO(90, 70)では、 $5.9\text{-}6.3^{\circ}$ と顕著な減少幅の違いが観られた。

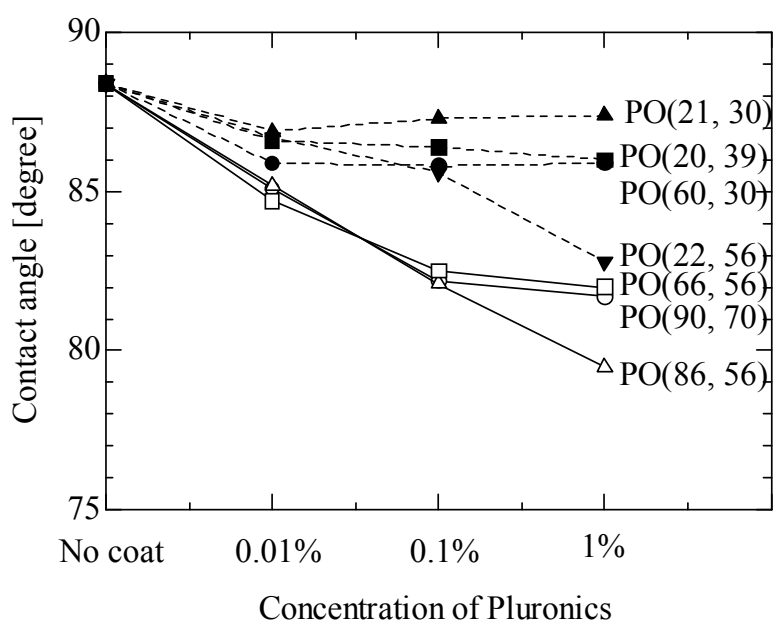
以上の結果から、PO 基比率が 20~22%と小さい分子構造のプルロニックで表面処理した場合の接触角の減少幅は小さく、逆に PO 基比率が 86, 90, 66%と高いと接触角の減少幅が大きく、PO 基比率が高いと接触角の減少幅が大きい傾向にある。しかし、PO 基比率が 60%と比較的高い PO(60, 30)においては、接触角の減少幅は小さく、PO 基比率が高いだけでは必ずしも接触角の減少幅が大きくなることを示している。

一方、PO 基の数に着目すると、PO(60, 30)の PO 基数は 30 個であり、PO(66, 56), PO(86, 56), PO(90, 70)の 56-70 個に対して少ない。このことから表面処理後の接触角の減少幅に PO 基数が影響すると考えられる。

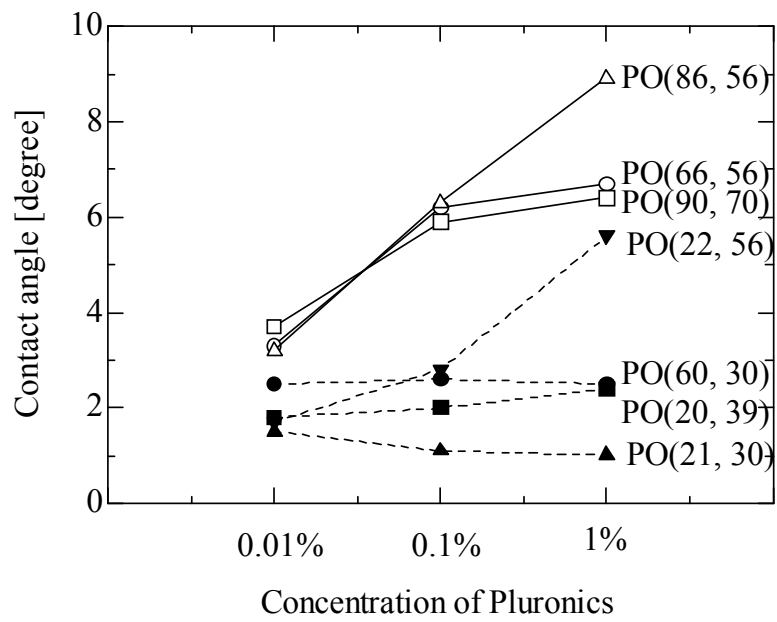
しかし、PO(20, 39)および PO(22, 56)の PO 基数にも着目すると、それぞれ、39, 56 個と PO(60, 30)よりも多く、PO 基数が多いだけでは必ずしも接触角の減少幅が大きくなることを示している。

表面処理後の接触角は、PO 基比率が高くかつ PO 基の数が多い分子構造を有するプルとニックで減少幅が大きいと言える。

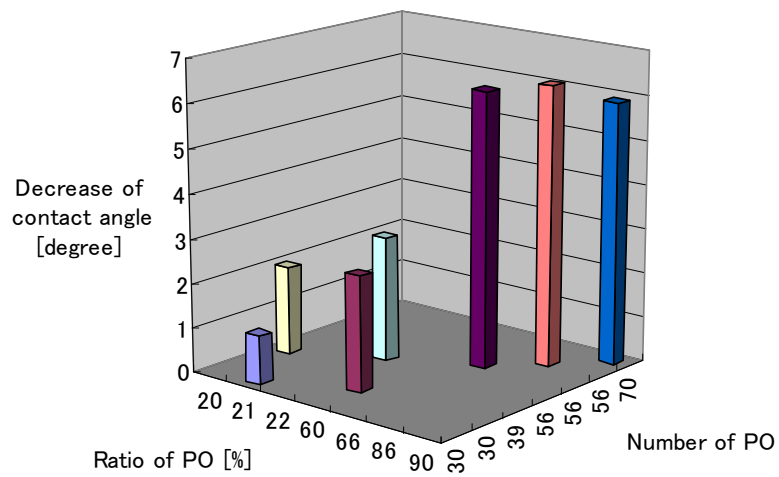
次いで、表面処理剤の濃度について考えると、図 4-12(b)に示すように PO 基数が 39 個以下の PO(21, 30), PO(20, 39), PO(60, 30)では濃度が高くなっても接触角の減少幅が変化しないのに対し、PO 基数が 56 個以上である PO(22, 56), PO(66, 56), PO(86, 56)および PO(90, 70)においては、濃度が高くなるにつれて接触角の減少幅が増大している。このことから、PO 基数が少ない（39 個以下）と表面処理剤の濃度を上げてても接触角の減少幅は変化しないが、PO 基数が多ければ（56 個以上）表面処理剤の濃度を上げることによって接触角の減少幅を大きくさせることができると言える。



(a)



(b)



(c)

図 4-12 表面処理溶液濃度と接触角
Fig.4-12 Measurements results of Contact Angles

4.5.2 指先血を用いた血液吸着評価

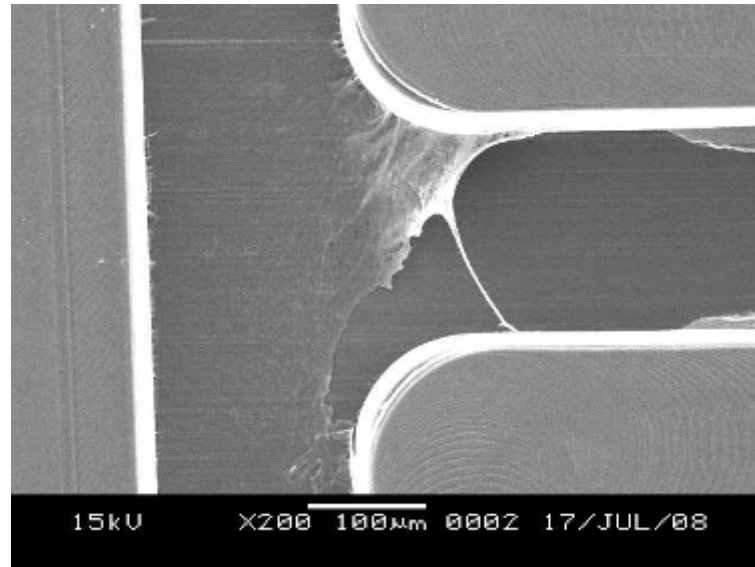
図 4-13 に指先血を用いた吸着評価実験で撮影したマイクロ流路の電子顕微鏡写真を示す。

図 4-13(a)は、表面処理を施さなかった場合のマイクロ流路の T 字形状の部分を撮影した電子顕微鏡写真であり、繊維状の吸着物が観られた。この繊維状の吸着物は、血液中の凝固因子であるフィブリンと考えられる。

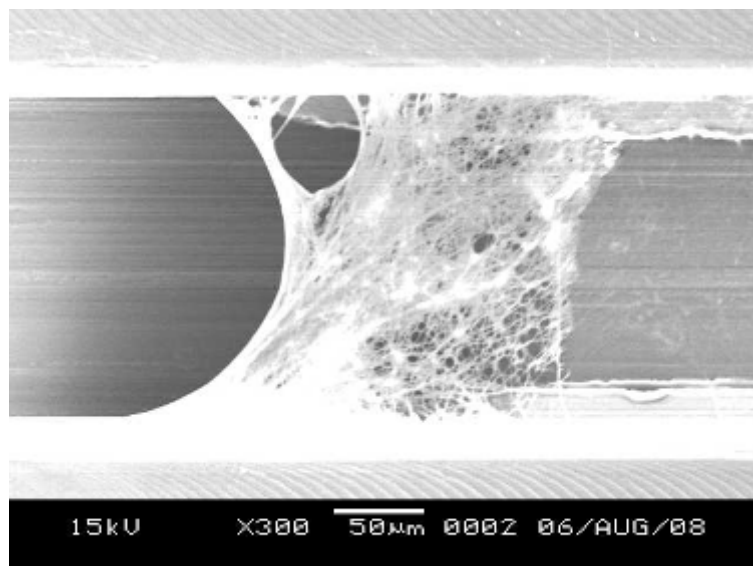
図 4-13(b)-(e)は、それぞれ、0.1%の PO(20, 39), PO(21, 30), PO(22, 56) および PO(60, 30)で表面処理したマイクロ流路の T 字形状の部分であり、表面処理無しの場合と同様に繊維状の吸着物が観られた。そして、PO(20, 39)および PO(21, 30)では、表面処理液濃度 1%においても同様に血液吸着が観られた。しかし、PO(22, 56)では、表面処理液濃度 1%においては、吸着物は観察されなかった。

一方、図 4-13(f)-(h)は、それぞれ、0.1%の PO(66, 56), PO(86, 56)および PO(90, 70)で表面処理したマイクロ流路の T 字形状の部分であり、繊維状の吸着物は観られなかった。図 4-13 に示す視野はマイクロ流路の一部であるが、この視野の範囲外においても、観察に用いた 3 個のポリスチレン流路成形品のすべてのマイクロ流路において吸着物は観察されなかった。また、表面処理液濃度 1%においても同様に血液吸着は観られなかった。

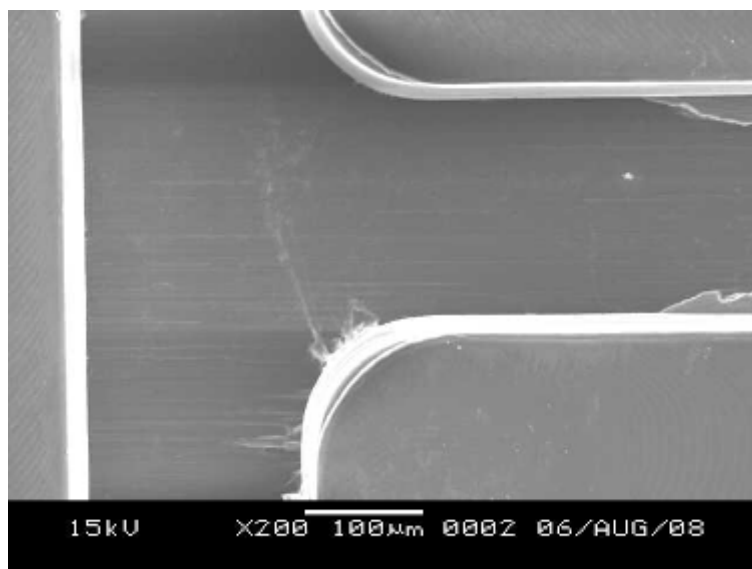
吸着物が観察されなかったプルロニックの分子構造・濃度の組み合わせは、接触角測定において表面処理後の接触角の減少幅が 5.6° 以上であったものと一致し、逆に吸着物が観察されたプルロニックの分子構造・濃度の組み合わせは、接触角の減少幅が 3.7° 以下であったものと一致した。



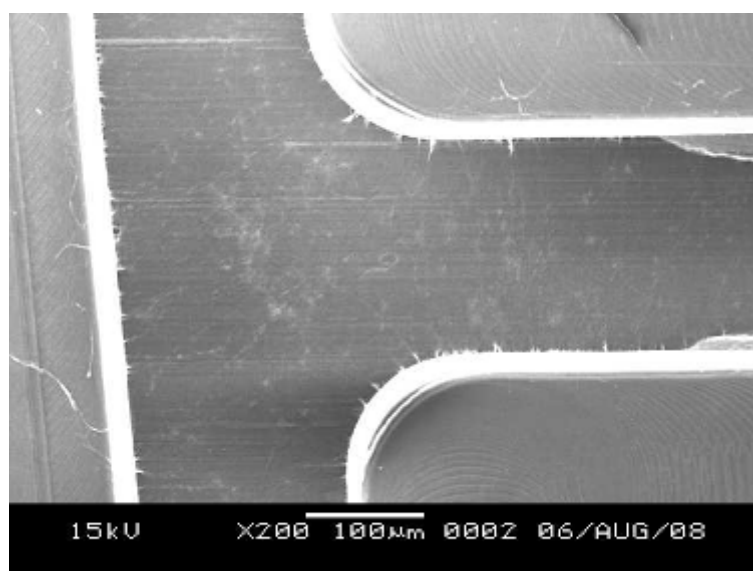
(a) No coated



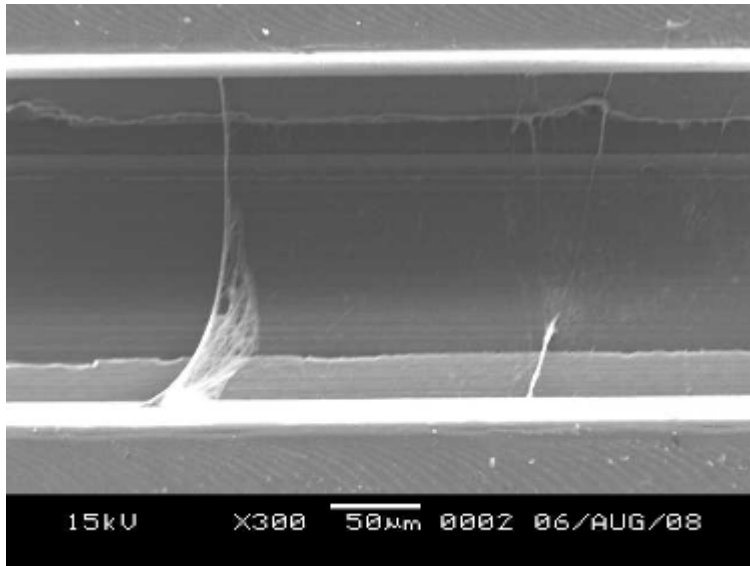
(b) Coated with PO(20, 39)



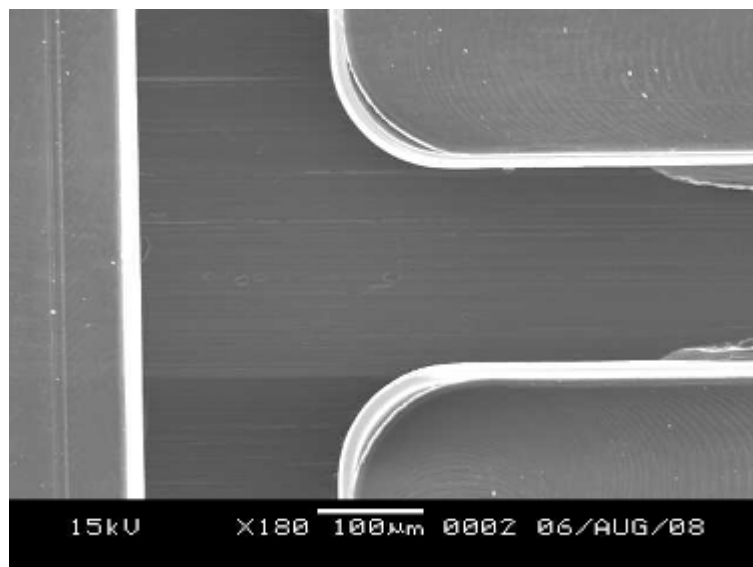
(c) Coated with PO(21, 30)



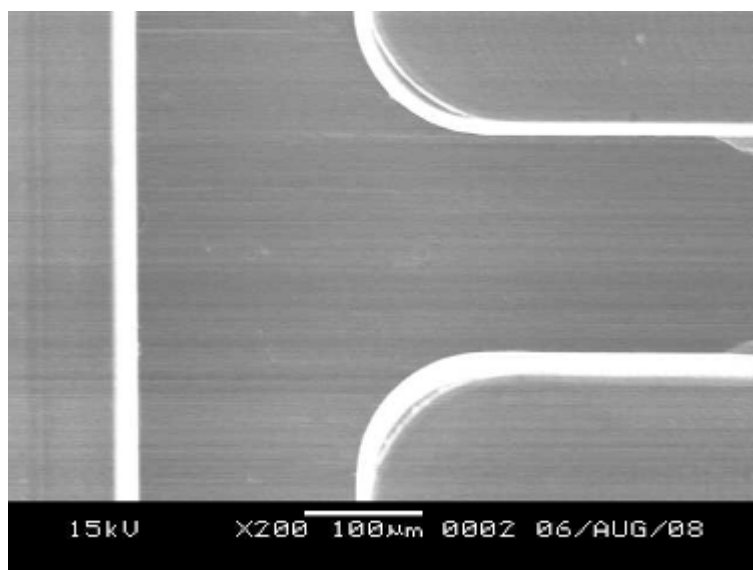
(d) Coated with PO(22, 56)



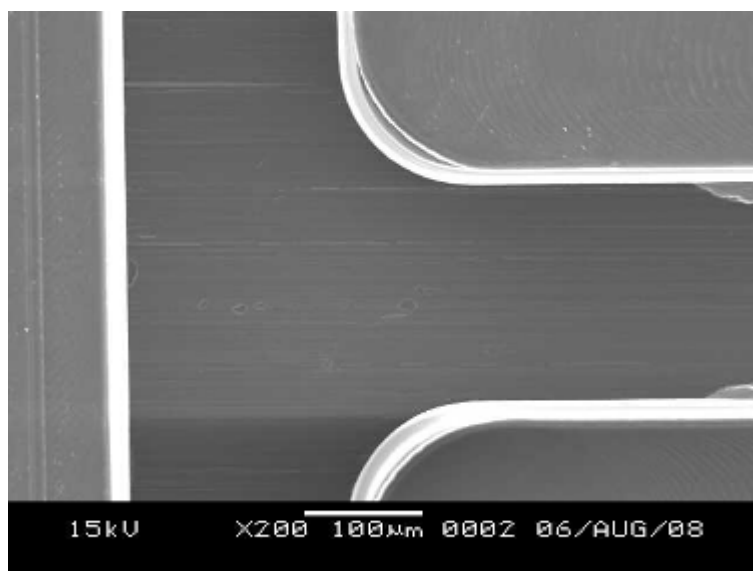
(e) Coated with PO(60, 30)



(f) Coated with PO(66, 56)



(g) Coated with PO(86, 56)



(h) Coated with PO(90, 70)

図 4-13 ポリスチレンマイクロ流路上のフィブリン吸着
Fig.4-13 SEM micrographs of fibrin adhesion on the channel of PS chip

4.5.3 蛍光標識抗体を用いたタンパク吸着量評価

図 4-14(a)に測定された蛍光強度からポリスチレンの自家蛍光をブランク値として差し引いた値を示す。蛍光強度の値が大きいほどより多くの蛍光標識抗体が吸着していることを示している。

図 4-14(b)には、蛍光強度の結果を無処理の場合の蛍光強度を 100%とした相対比として示す。それぞれのプルロニック分子構造の蛍光強度の相対比を表 4-2 に示す。

表 4-2 表面処理剤別の無処理に対する蛍光強度相対比

Table.4-2 Relative ratio of fluorescence intensity to no coat

Surface preparation agent	Relative ratio of fluorescence intensity (%)
No coat	100
PO(20, 39)	71
PO(21, 30)	95
PO(22, 56)	58
PO(60, 30)	99
PO(66, 56)	43
PO(86, 56)	7
PO(90, 70)	27
MPC	53

表 4-2 および図 4-14(b)に示すように、血液吸着評価実験の結果と同様、PO(66, 56), PO(86, 56)および PO(90, 70)の蛍光強度がその他に比較して小さく、また、対照の MPC ポリマーで表面処理されたものの蛍光強度よりも小さく、タンパク質の吸着を抑制していることが分かる。

また、接触角の減少幅を示す図 4-12(c)と蛍光強度の相対比を示す図 4-14(b)の比較から、接触角の減少幅が大きい表面処理剤と蛍光強度相対比が小さい表面処理剤が一致していることが分かる。これは、ポリスチレン表面に多くのプルロニックが残留するとタンパク質吸着を抑制できることを示す。

血液吸着を抑制可能であった PO(66, 56), PO(86, 56)および PO(90, 70)は、PO 基比率が 66%以上であり、かつ PO 基数が 56 以上である。一方、タンパク質吸着の抑制が不十分であった PO(22, 56)は、PO 基数は 56 以上であったが、PO 基比率は 22%と低い値であった。同様に PO(60, 30)は、PO 基比率は 60%と比較的に高かったものの、PO 基数は 30 と低い値であった。これらのことから、タンパク質の吸着抑制に必要な数のプルロニック分子がポリスチレン表面に残留するためには、一定以上の PO 基比率、かつ、一定以上の PO 基数が必要であると考えられる。

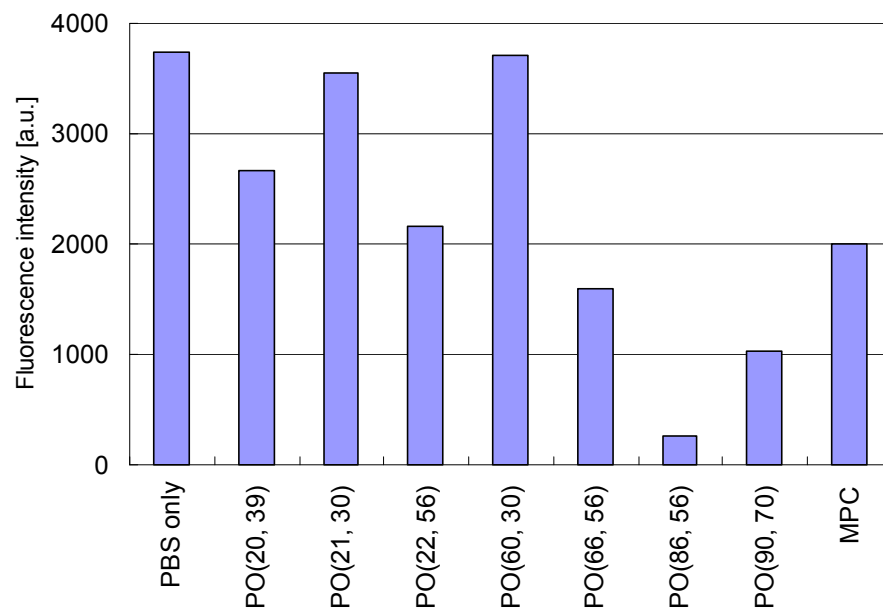
プルロニックは、疎水基である PO 基がポリスチレン表面と疎水結合することによってポリスチレン表面に残留する（図 4-2）ため、疎水基の比率が高いとより多くの疎水結合が生成すると考えられ、ポリスチレン表面への残留効率が低いと考えられる。また、疎水基の数が多いと、より多くの疎水基が疎水結合に関与するため、洗浄時に外れない強固な疎水結合が生成すると考えられる。すなわち、疎水結合の生成率に PO 基比率が関係し、疎水結合の結合力に PO 基数が関係すると考えられる。

一方、PO(22, 56)においては、表面処理溶液濃度が 0.01 および 0.1%では血液吸着評価実験において吸着物が観察されたが、1%では観察されなかった。この現象は、PO 基比率が十分でないために疎水結合の生成率は低い、PO 基数が十分であるために疎水結合の結合力は強く、表面処理液の濃度を上げることによって疎水結合の生成率の低さが補われ、タンパク質の吸着抑制に必要な数のプルロニック分子がポリスチレン表面上に残留したと考えられる。

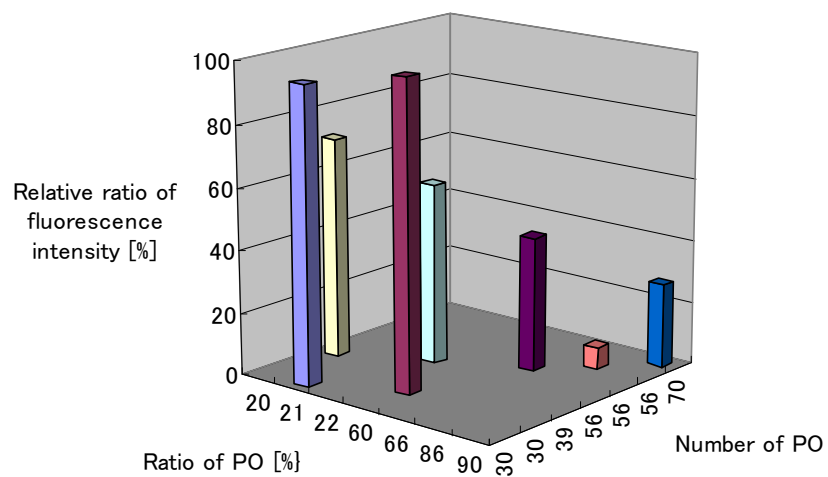
次いで、PO(86, 56)が、PO 基比率が高く PO 基数も多い PO(90, 70)よりも接触角の減少幅が大きく、蛍光標識抗体を用いた実験においても蛍光強度が小さいことについて考察する。PO(86, 56)は、EO 基が 6 つ PO(90, 70)の 5 つよりも多い。このため、EO 基によるタンパク質分子の接近に対する立体障害の効果が高かったと考えられる。

以上をまとめると、従来の研究では、PO 基比率が低いプルロニックが用いられたが、短い表面処理（表面処理溶液への浸漬）時間の場合、PO 基数が多くかつ PO 基比率が高い分子構造を有するプルロニックの

方がポリスチレン表面への残留効率に優れ、結果として良好な血液吸着抑制能を示したと考えられる。加えて、タンパク質吸着の抑制には、EO 基による立体障害の効果も考えられ、本実験の結果からは、PO 基比率が 66%以上、PO 基数 56 以上かつ EO 基数 6 以上の分子構造を有するプルロニックが、前処理なしに短時間で行う表面処理にておいて、効果的なタンパク質吸着抑制能を有すると考えられる。



(a)



(b)

図 4-14 蛍光標識抗体吸着後の蛍光強度
Fig.4-14 Fluorescent intensity of Dylight-IgG

4.6 結言

血液および蛍光標識抗体を用いたポリスチレン表面へのタンパク質吸着の実験結果から、PO 基比率が高く、かつ PO 基数が多い分子構造を有するプルロニックによる表面処理が MPC ポリマーを用いた表面処理以上にタンパク吸着抑制に優れることが示された。

本章の表面処理を血球計数デバイスに用いることにより、血液吸着に起因する誤差を低減させる効果が期待できる。

参考文献

- [1] 岩田博夫, バイオマテリアル, 共立出版 (2005)
- [2] R. Hoffman, E. J. Benz Jr., S. J. Shattil, B. Furie, H. J. Cohen, L. E. Silberstein, P. MoGlave, Hematology: Basic Principles and Practice, fourth ed., Churchill Livingstone, 2004.
- [3] 石原一彦, 山岡哲二, 畑中研一, 大矢裕一, バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人 (2003)
- [4] E. N. Vasina, E. Paszek, D. V. Nicolau, Jr, D. V. Nicolau, The BAD project: data mining, database and prediction of protein adsorption on surfaces, Lab on a Chip 9 (2009) 891-900.
- [5] Ishihara K, Ziats NP, Nakabayashi N, Anderson JM, Protein adsorption from human plasma is reduced on phospholipid polymers, Journal of biomedical materials research 25 (1991) 1397-1407.
- [6] J. Sibarani, M. Takai, K. Ishihara, Surface modification on microfluidic devices with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers for reducing unfavorable protein adsorption, Colloids and surfaces. B, Biointerfaces 54 (2007) 88-93.
- [7] T. Goda, T. Konno, M. Takai, T. Moro, K. Ishihara, Biomimetic phosphorylcholine polymer grafting from polydimethylsiloxane surface using photo-induced polymerization, Biomaterials 27 (2006) 5151-5160.
- [8] S. H. Ye, J. Watanabe, Y. Iwasaki, K. Ishihara, Novel cellulose acetate membrane blended with phospholipid polymer for hemocompatible filtration system, Journal of Membrane Science 210 (2002) 411-421.
- [9] M. Kyomoto, T. Moro, K. Saiga, F. Miyaji, H. Kawaguchi, Y. Takatori, K. Nakamura, K. Ishihara, Lubricity and stability of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) polymer layer on Co-Cr-Mo surface for hemi-arthroplasty to prevent degeneration of articular cartilage, Biomaterials 31 (2010) 658-668.
- [10] J. H. Lee, B. J. Jeong, H. B. Lee, Plasma protein adsorption and platelet adhesion onto comb-like PEO gradient surfaces, Journal of biomedical materials research 34 (1997) 105-114.

- [11] M. Farrell, S. Beaudoin, Surface forces and protein adsorption on dextran-and polyethylene glycol-modified polydimethylsiloxane, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81 (2010) 468-475.
- [12] A. Papra, A. Bernard, D. Juncker, N. B. Larsen, B. Michel, E. Delamarche, Microfluidic networks made of PDMS, Si, and Au coated with PEG for patterning proteins onto surfaces, *Langmuir* 17 (2001) 4090-4095.
- [13] K. Yu, Y. Han, A stable PEO-tethered PDMS surface having controllable wetting property by a swelling-deswelling process, *Soft Matter* 2 (2006) 705-709.
- [14] H. Bi, S. Meng, Y. Li, K. Guo, Y. Chen, J. Kong, P. Yang, W. Zhong, B. Liu, Deposition of PEG onto PMMA microchannel surface to minimize nonspecific adsorption, *Lab on a Chip* 6 (2006) 769-775.
- [15] Y. Xiao, X. D. Yu, J. J. Xu, H. Y. Chen, Bulk modification of PDMS microchips by an amphiphilic copolymer, *Electrophoresis* 28 (2007) 3302-3307.
- [16] Z. Wu, Klas Hjort, Surface modification of PDMS by gradient-induced migration of embedded Pluronic, *Lab on a chip* 9 (2009) 1500–1503.
- [17] Q. Shi, S. Ye, C. Kristalyn, Y. Su, Z. Jiang, Z. Chen, Probing molecular-level surface structures of polyethersulfone/Pluronic F127 blends using sum-frequency generation vibrational spectroscopy, *Langmuir* 24 (2008) 7939-7946.
- [18] M. Amiji, K. Park, Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers, *Biomaterials* 13(10) (1992) 682-692.
- [19] Duliba E., Lowther G., The safety and eddicacy of a new contact lens cleaner/rinse solution containing the surfactant pluronic 17R4: A review, *Today's Therapeutic Trends*, 13 (2) (1995) 39-46.

第 5 章 マイクロコールターカウンタ

5.1 緒言

本研究の目的である血球計数検査を POCT (Point of care testing) に適用するデバイスを実現するため、第 2 章及び第 3 章において、血液の前処理工程に用いる微量血液の計量機構及び混合機構について示し、第 4 章では、デバイスのマイクロ流路内壁への血液の付着を防止するためのタンパク質吸着抑制表面処理の有効性を示した。そして本章では、前処理工程の後の測定工程、すなわち血球の計数計測に用いるマイクロコールターカウンタについて論述する。

以下にマイクロコールターカウンタの微粒子計測原理、及び、マイクロコールターカウンタを血球計数検査に適用するために解決すべき課題について詳述する。

1940 年代後半に W.H.Coulter によって考え出された微粒子計測法^{[1][2]}は、コールター法と呼ばれ、60 年以上経った現在も世界中の精密粒度分布測定装置に用いられている^[3]。コールター法の測定系は、図 5-1 に示すように、微細孔（以下、アパーチャ）で通じた 2 槽に電解質溶液中に粒子が分散した液が満たされ、2 槽にそれぞれ電極が配置されているというものである。一方の槽から他方へ粒子分散電解質溶液を流すことにより粒子がアパーチャを通過するとき、アパーチャ内の電解質溶液の一部が粒子に置き換わるため、電極間の電気抵抗が増加し、図 5-2 に示すようにアパーチャを粒子が通過する時間巾を持つパルス状の電気抵抗変化（以下、抵抗パルス）を測定することができる。この抵抗パルスを検出することで粒子を検出し、抵抗パルスの数を計数することで粒子数を計測することができる。更に、アパーチャを通過する液量を制御することによって、粒子濃度、すなわち単位体積あたりの粒子数を測定することも可能である。

コールター法は、血液中の微粒子である血球を計数することにも利用されており、現在も血球計数装置の基本原則として用いられている。しかし、従来の血球計数装置が比較的大型であること、血液がアパーチャに詰まりやすくメンテナンス性に問題があることなどから、近年、

小型化やディスポーザブル化を目的として、コールター法の微粒子計測デバイス（以下、マイクロコールターカウンタ）をマイクロ流路を用いて作製する研究が盛んに行われている^{[4]-[6]}。U. D. Larsen ら^[7]は、シリコンを材料としてエッチングによってマイクロ流路を作製し、金電極をパターニングしたガラス板と貼り合わせたマイクロコールターカウンタを報告している。しかしながら、このマイクロカウンタは、計数対象となる試料の液量を制御する手段を有していないため、血球濃度、すなわち試料液の単位体積あたり血球数を求めるためには、デバイス外部から試料液の量を制御しなければならないという問題があった。この試料液量の制御のため、従来の血球計数装置では、試料の流速を一定に保ちながら一定時間の測定を行うことによって試料液量を一定とする方法が用いられているが、マイクロコールターカウンタでは、流路が小さいため、管抵抗が大きく、流速の一定化には精密な外部ポンプを必要とする。そこで、Lee ら^[8]は、マイクロコールターカウンタにおいて、流速を一定にすることなく試料液量を一定化するため、図 5-3(a)に示すように、一定容積部の入口と出口に 2 つのアーチャーとそれぞれに 1 組の電極を設けたマイクロコールターカウンタを提案している。図 5-3(b)は、2 つのアーチャーでそれぞれ検出される粒子数とそれらの差を示しており、横軸が時間、縦軸が粒子数（抵抗値パルス数）である。 $N_{in}(t)$ の添字で示した実線が一定容積部の入口で検出された粒子数を示し、 $N_{out}(t)$ の添字で示した実線が一定容積部の出口での粒子数を示し、 $N_{in}(t) - N_{out}(t)$ の添字で示す点線が入口の検出粒子数と出口の検出粒子数の差を表す。図 5-3(b)に示すように、 $N_{in}(t) - N_{out}(t)$ の値は、一定容積部を試料が満たした時点以降において一定値を示し、この値が一定容積部の粒子数を表す。しかし、この方法は、2 つのアーチャーと 2 組の電極を必要とするため製造コストが高くなる上、2 組の電極でそれぞれに抵抗値を測定する装置を必要とするため、デバイス、装置共に複雑となる。より簡易な構造によって試料液量を一定化する手法が必要である。

一方、POCT に用いる血液検査デバイスでは、コンタミネーションの防止、使用者の感染防止、及びデバイスの洗浄機構等によって検査装置が複雑になることを防ぐため、デバイスが使い捨てであることが

求められる。このため、デバイスの材料は、使い捨て可能な安価な材料であることが必要であり、樹脂材料が好適である。しかし、樹脂材料表面にはタンパク質が吸着し易いという性質がある^{[9][10]}。このため、血球計数用の POCT デバイスにおいては、マイクロ流路内壁に血球が付着し、付着した血球がアパーチャを通過せず、計数結果に負誤差が生じる恐れがあり、マイクロ流路内壁への血球付着を防止する必要がある。マイクロコールドカウンタに対する血球付着防止の報告は無いが、生体試料を取り扱うための樹脂製マイクロ流路へのタンパク質吸着の抑制として、Ishihara ら^[11]は、PDMS (polydimethylsiloxane) 製マイクロ流路表面への MPC(2-methacryloyloxyethylphosphoryl- choline) ポリマー^[12]による表面処理を報告している。しかし、MPC ポリマーは高価であり、また、この研究では、血球のマイクロ流路への付着についての評価はなされていない。より安価な手法による血球吸着の抑制と血液を用いた血球吸着抑制の評価が必要である。

本研究では、マイクロコールドカウンタを血球計数用 POCT デバイスに適用するため、①血球計数する試料液量の一定化、②マイクロ流路への血球付着抑制の課題を解決する手法を提案し、その手法に基づいたマイクロコールドカウンタを作製するとともに、作製したマイクロコールドカウンタの性能を血液試料を用いた実験によって評価し、その有効性を考察する。

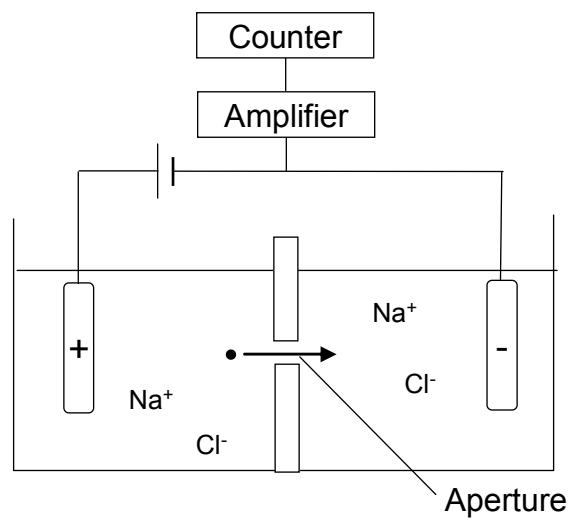


図 5-1 コールターカウンタの微粒子計測原理
Fig.5-1 Schematic of a Coulter counter

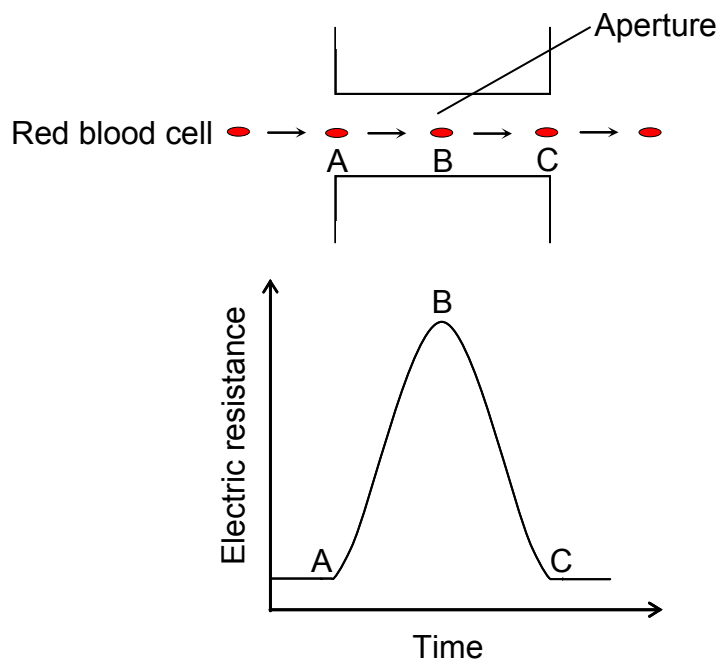
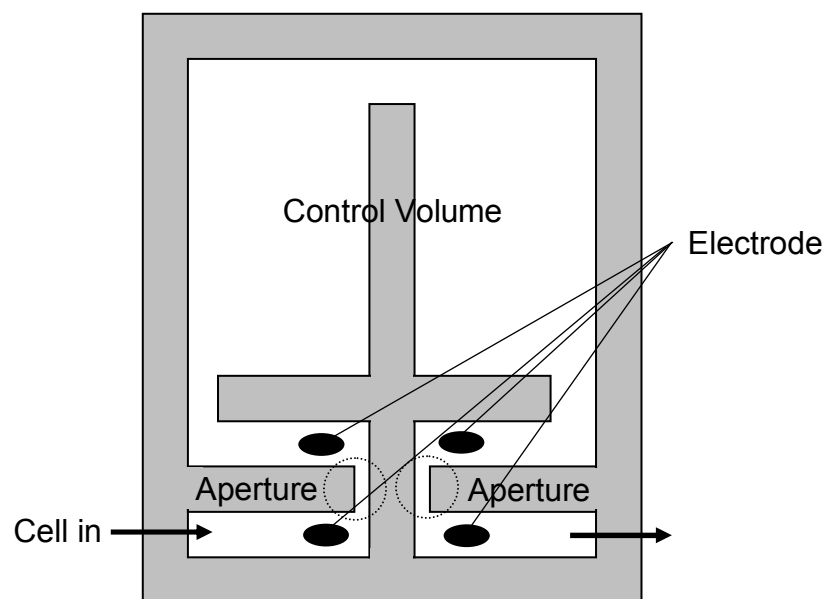
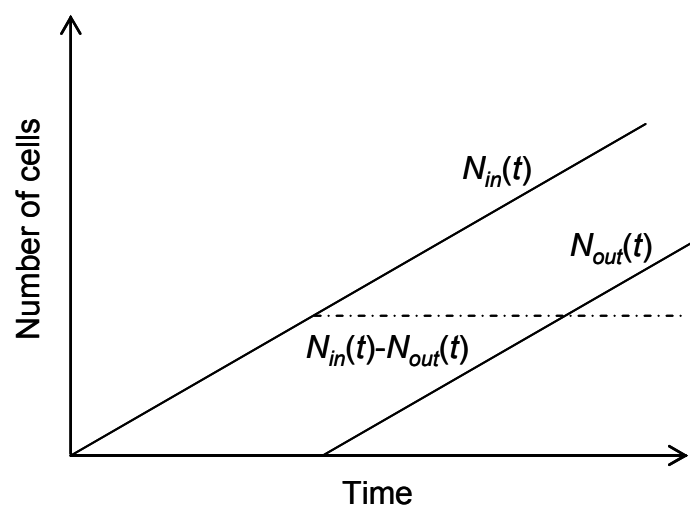


図 5-2 コールター原理の模式図
Fig.5-2 Schematic of a Coulter principle



(a) Schematic illustration of the device



(b) Time course of cell counting number

図 5-3 計数液量一定化手法の例

Fig.5-3 An example of fixing counting volume

5.2 マイクロコールドターカウンタの作製方法

コールドター法を検出原理とし、マイクロ流路成形品と電極シートから構成されるマイクロコールドターカウンタを作製した。図 5-4 に作製したマイクロコールドターカウンタの写真を示す。以下にマイクロコールドターカウンタの作製方法を示す。

5.2.1 マイクロ流路成形品

本研究で目的とする POCT 用デバイスには低価格が要求されるため、マイクロ流路成形品は、安価なポリスチレンを材料として射出成形によって作製した。

図 5-5 に作製したマイクロ流路成形品の構造を示す。マイクロ流路成形品は、試料液を入れるためのインレット（貫通孔）、インレットに連通するマイクロ流路（溝構造）及び、試料液をマイクロ流路に流すため空気を吸引するアウトレット（貫通孔）から構成した。図 5-6 に示すように、インレットに試料液体を入れた状態で、アウトレットからシリンジポンプを用いて空気を吸引することにより、インレットからアウトレットに向けてマイクロ流路内に試料液を流すことができる。マイクロ流路の一部には、巾 $50\mu\text{m}$ 深さ $50\mu\text{m}$ 長さ $50\mu\text{m}$ の狭窄部を有し、これが、アパーチャとして機能する。また、マイクロ流路のアパーチャ前後の巾 $2000\mu\text{m}$ の巾広部は、図 5-4 に示すように、血球のアパーチャ通過を検出するための計数電極に対応している

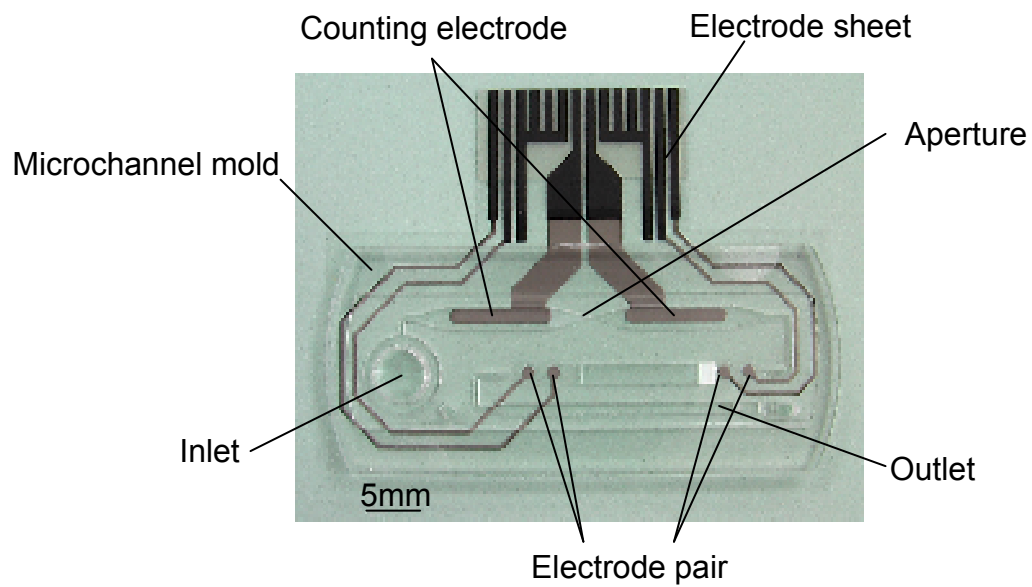


図 5-4 マイクロコールターカウンタ

Fig.5-4 Micro Coulter counter

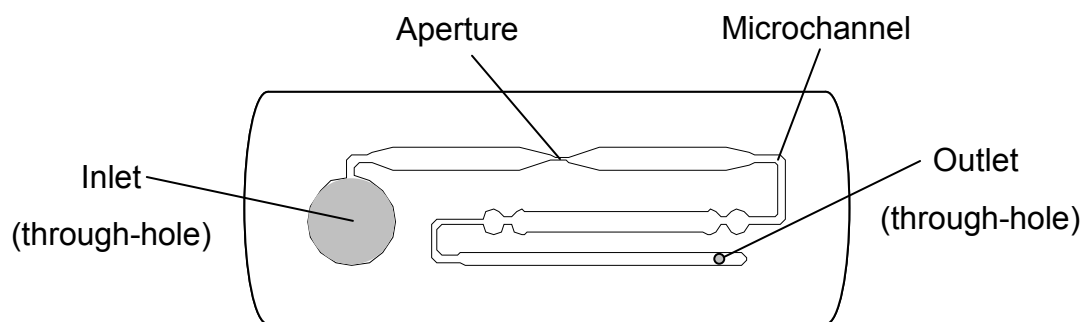


図 5-5 マイクロ流路成形品

Fig.5-5 Microchannel mold

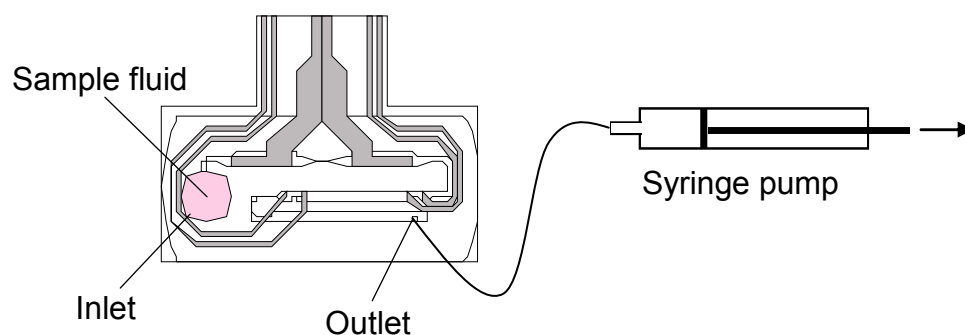


図 5-6 マイクロコルターカウンタの送液方法

Fig.5-6 Method of sample fluid flow

5.2.2 電極シート

電極シートは、PET シート上に銀インク及び PDMS インクを印刷することによって作製した。

はじめに、印刷工程について述べる。図 5-7 に電極シートの断面図を示す。図 5-7 に示すように、電極シートは、PET シート上に銀インク層及び PDMS インク層を積層した断面構造を有する。この断面構造は、先に銀インクで電極及びリード線を印刷・乾燥させ、次いでその上に PDMS インクを印刷することにより作製した。PDMS 層の印刷パターンは、電極のみが試料液と接触し、リード線部分が試料液と接触しないようにするため、電極部のみを露出させ、リード線を被覆するものとした。PDMS 層は、リード線の被覆だけでなく、PDMS の自己粘着性を利用して、電極シートとマイクロ流路成形品の接着層としても用いた。

次に、電極部の親水化表面処理を行った。電極部となる銀印刷の表面は、疎水性であるため、試料液と接触した際に電極表面全体が濡れる状態とならず、気泡が生成して電極測定ノイズになる恐れがあるため、作製した電極シートには、電極部を親水化するための表面処理を施した。この親水化表面処理には、予め赤血球を溶血させにくい特性であることを実験的に確かめた界面活性剤であるスクロースラウレートを用いた。図 5-8 に示すように、スクロースラウレート（同仁化学）/エタノールの 0.01%エタノール溶液を銀電極表面に 0.1 μ L を滴下し、室温環境下で 8 時間以上乾燥させた。

上述のように作製した電極シートとマイクロ流路成形品を PDMS 層の自己粘着性によって貼り合せ、図 5-4 に示すマイクロコールドターカウンタを作製した。

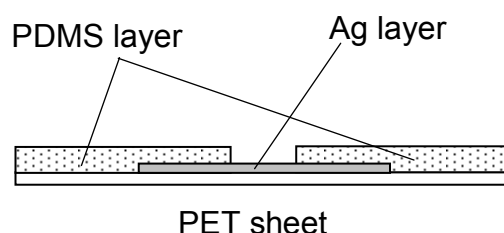


図 5-7 電極シートの断面図
Fig.5-7 Cross-section of electrode sheet

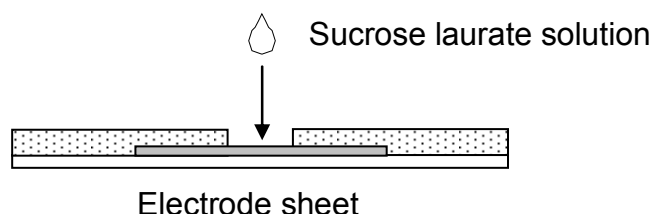


図 5-8 電極シートの親水化表面処理
Fig.5-8 Hydrophilic surface treatment of electrode sheet

5.3 課題解決の提案

本研究のマイクロコールターカウンタは、

- ① 血球を計数する試料液量の一定化機能
- ② マイクロ流路への血球付着抑制の機能を有する。

以下にそれぞれの機能を付与するための手法について述べる。

5.3.1 試料液量の一定化

試料液量の一定化は、一定容積のマイクロ流路両端において試料液の通過を検知し、一定容積のマイクロ流路入口の試料液通過から出口の試料液通過まで計数測定を行う手法を用いた。以下に手法の詳細について述べる。

電極シートは、図 5-9(a)に示すようにアパーチャを挟んで 2 つのの計数電極を有するのに加え、その下流に、第一電極対、第二電極対の二組の電極対を有する。図 5-9(a)に示すように、測定前、マイクロ流路には液体が入っていないので、第一電及び第二電極対の間は空気によって絶縁されている。ここでマイクロ流路に試料液を流すと、図 5-9(b)に示すように、第一電極対の上を電解質溶液である試料が通過するとき、第一電極対間の電気抵抗が絶縁から導通へと変化する。更に試料液を流し続けると、図 5-9(c)に示すように、第一電極対と第二電極対の間に挟まれた位置のマイクロ流路が試料液で満たされ、その後、第二電極対上を試料液が通過し、第二電極対間のこの絶縁から導通へと変化する。このように、電極対間の絶縁から導通への変化を検知することによって、電極対上を試料液が通過したことを検知できる。そして、図 5-9(b)に示すように第一電極対の上を試料が通過するのを第一電極対で検知したタイミングに血球計数を開始し、図 5-9(c)に示すように第一電極対と第二電極対の間に挟まれた位置のマイクロ流路が試料液で満たされる間に血球計数計測を行い、第二電極対の上を試料が通過するのを検知したタイミングに血球計数を終える。このような計測方法を用いることによって、第一電極対と第二電極対に挟まれたマイクロ流路の内容積に等しい量、すなわち一定容積の試料に含まれる血球を計数計測することができる。

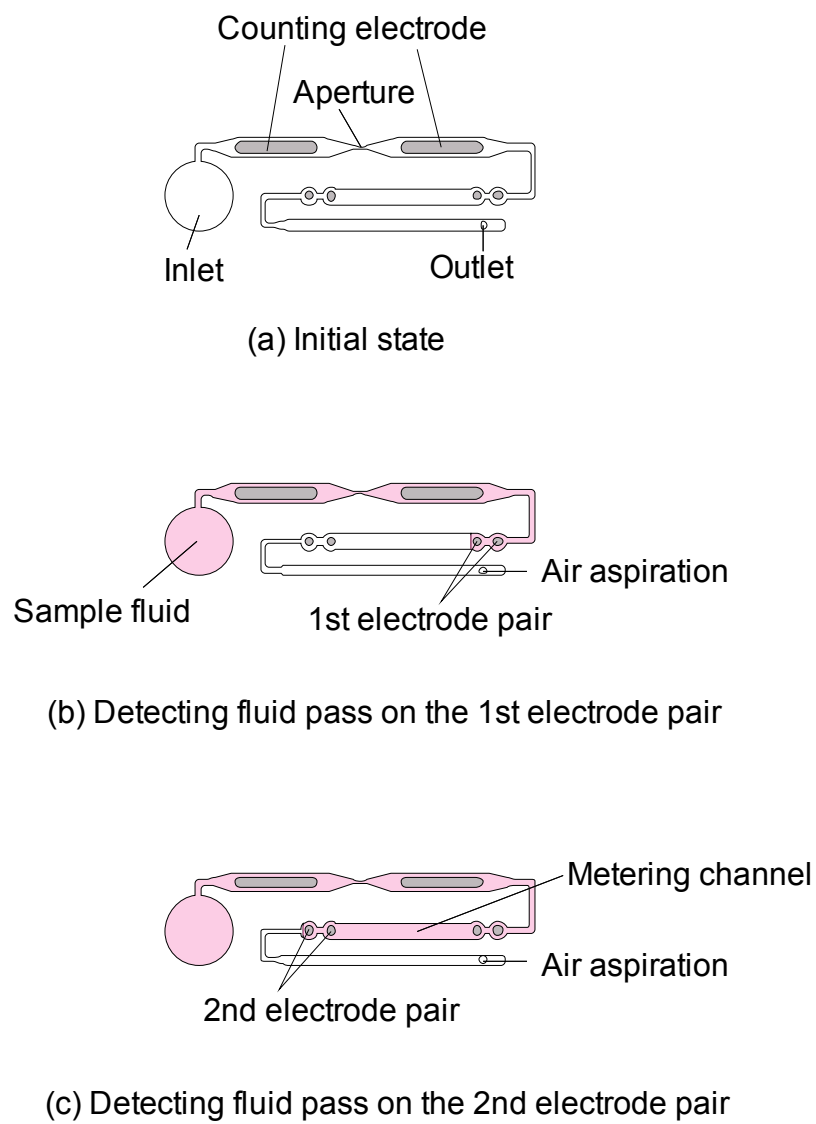


図 5-9 試料液一定化の方法
Fig.5-9 Schematic diagram of fixed volume counting

5.3.2 マイクロ流路への血球付着抑制

マイクロ流路内壁への血球付着抑制のため、第 4 章においてその有効性を示したプルロニックを表面処理剤とした表面処理の手法を用いた。第 4 章で示したとおり、プルロニックは安価な材料であり、かつ、マイクロ流路への紫外線照射等の前処理を必要とせず、単に表面処理液に浸漬するだけの簡易な表面処理が可能であることから、安価に製造する必要のある使い捨てのデバイスに適した表面処理剤である。また、第 4 章において、血球を含む全血を試料とした評価を行い、全血の吸着を抑制できることを確認していることから、マイクロ流路への血球付着の抑制が可能であると考えられる。

図 5-10 に表面処理の手順を示す。はじめに、図 5-10(a)に示すように、マイクロ流路成形品を蒸留水で洗浄後、室温環境下で 8 時間以上乾燥させた。次に、第 4 章の評価において最もタンパク質吸着の抑制に効果的であったプルロニック L101 をリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) に溶解し、1 wt% 溶液とした。そして、第 2 章および第 4 章で使用したものと同一の PET (polyethylene terephthalate) と PDMS の二層からなる自己粘着シートをマイクロ流路成形品に貼り合わせた (図 5-10(b)) 後、調製した溶液をマイクロ流路成形品のインレットに滴下し、アウトレットからシリンジポンプを用いて空気を吸引することでマイクロ流路にプルロニック溶液を流入した (図 5-10(c))。その後、室温環境下に 10 分間放置してから自己粘着カバーシートを剥がし、洗ビンを用いて 50mL 以上の蒸留水で十分に洗浄した (図 5-10(d))。その後、室温環境下で自然乾燥させた。

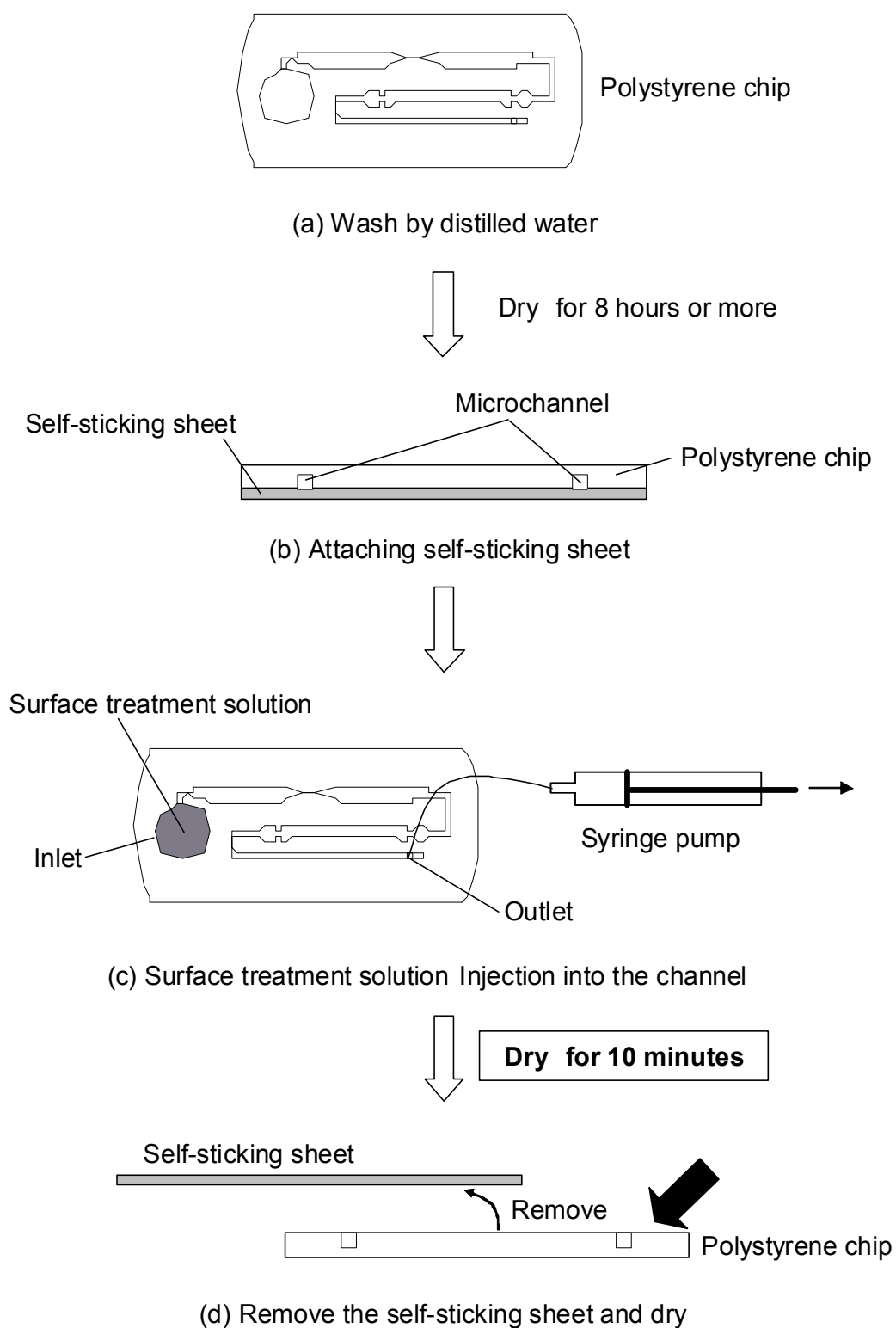


図 5-10 タンパク質吸着抑制表面処理の手順

Fig.5-10 Procedure of surface treatment for inhibition of protein adsorption

5.4 実験方法

作製したマイクロコールドターカウンタの正確性、精密性を評価することを目的に以下の2つの計測をおこなった。

まず、作製したマイクロコールドターカウンタの粒子検出原理が機能していることを評価することを目的に、更に、試料液量一定化機構とマイクロ流路のタンパク質吸着抑制表面処理が血球計数の正確性及び精密性に及ぼす効果を評価するため、

- 1) 血球のアパーチャ通過観察と電気抵抗測定値の同期計測
- 2) 赤血球計数計測

を行った。

以下に、2つの実験方法を示す。

5.4.1 血球のアパーチャ通過観察と電気抵抗測定値の同期計測

作製したマイクロコールドターカウンタが血球のアパーチャ通過を検出できることを評価するため、顕微鏡下での赤血球通過の高速度カメラ撮影と電極間抵抗値の同期測定を行った。

実験系の模式図を図 5-11 に示す。図 5-11 に示すように、マイクロコールドターカウンタを顕微鏡 (TE200-U, NIKON) 下におき、赤血球分散溶液をマイクロコールドターカウンタに流しながら、高速度カメラ (MotionPro HS-4, Redlake Digital Imaging Systems) でアパーチャ部を 2 万コマ/秒の速度で撮影し、同時に高速度カメラの撮影と同期させながら電気抵抗値を測定した。

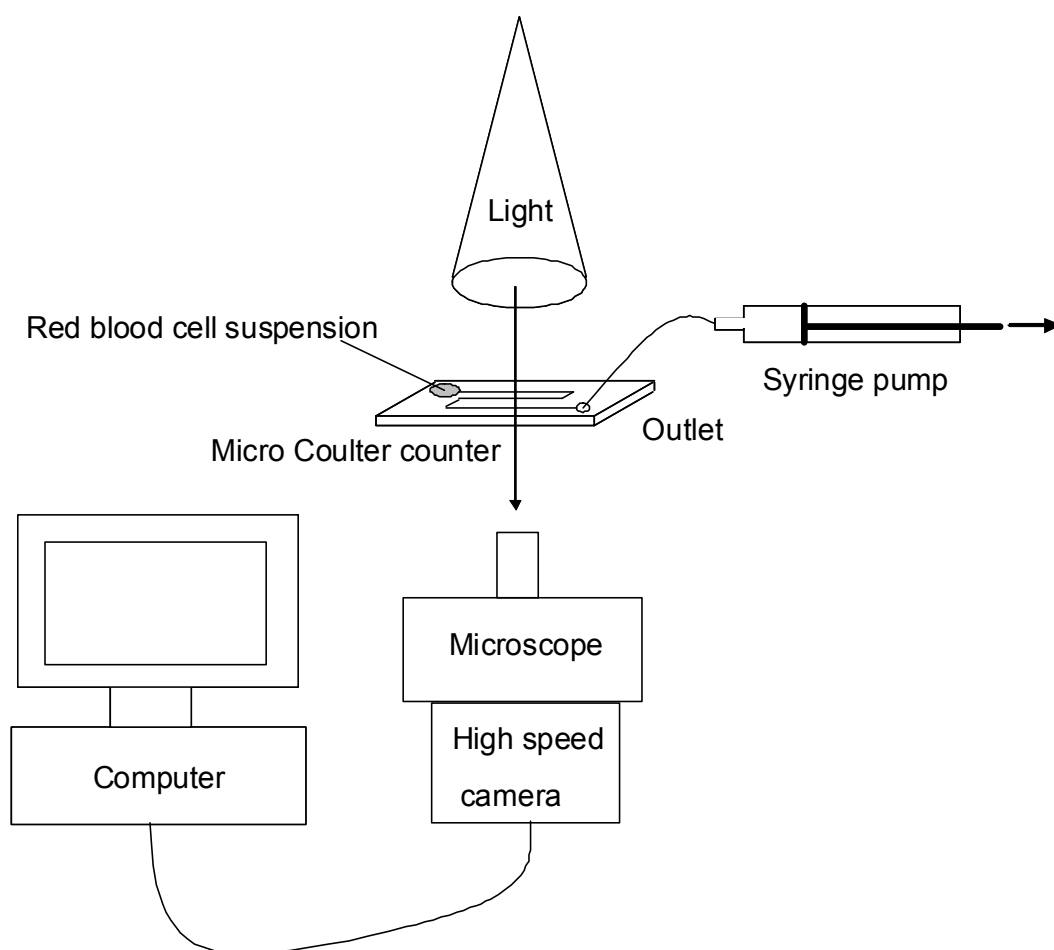


図 5-11 コーラー原理検証実験の測定系

Fig.5-11 Experimental setup for validation of Coulter principle

5.4.2 赤血球計数計測

試料液量一定化機構の効果を評価する手法としては、2 つの電極対の間にあるマイクロ流路に満たされる試料液量を計測する方法が直接的であるが、気泡無くマイクロ流路が試料で満たされていることを確認するだけでは定量的な評価とならないため、マイクロコールターカウンタの計数結果の精密性を評価することとした。また、マイクロ流路のタンパク質吸着抑制表面処理の効果を評価するため、タンパク質吸着抑制表面処理を施したマイクロコールターカウンタと、表面処理していないマイクロコールターカウンタを用いて、計数測定を行った。加えて、従来の自動血球計数装置との性能比較のため、汎用の血球計数装置（SB-1420, アークレイ）を用い、マイクロコールターカウンタの実験に用いたのと同じ血液試料を用いて赤血球数を測定した。

図 5-12 に赤血球計数の実験系を示す。図 5-12 に示す電気抵抗測定回路、および、第一，第二電極対の抵抗値変化の検知と同時にトリガー信号をパソコンに送るトリガー発生回路が組み込まれた試料液量一定化回路システムは、自作した。電気抵抗測定回路及び試料液量一定化回路システムを電極シートのリード部に接続し、更に、A/D 変換ボードを介してパソコンに接続した。

測定手順の詳細を以下に述べる。

まず、ヘパリン Na（抗凝固剤）入りの真空採血管を用いて静脈採血した全血をリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4）で 1 万倍に希釈して赤血球分散液を調製した。この赤血球分散液をマイクロコールターカウンタのインレットに入れ、アウトレットからシリンジポンプで 1 μ l/sec で空気吸引することにより、マイクロ流路に赤血球分散液を流した。そして、第一電極対上の試料通過を試料液量一定化回路システムで検知し、同時にトリガー信号を生成させ、このトリガー信号を受け取った電気抵抗測定回路が血球計数を開始し、第二電極対上の試料通過時に生成するトリガー信号で血球計数を終了した。電気抵抗測定回路で測定する抵抗値は、10 μ sec 毎にパソコンに取り込んだ。次いで、取り込んだ抵抗値データから、血球のアパーチャ通過を表す抵抗値パルスを自作の解析ソフトで識別し、そのパルス数を計数することによって赤血球数を計数した。

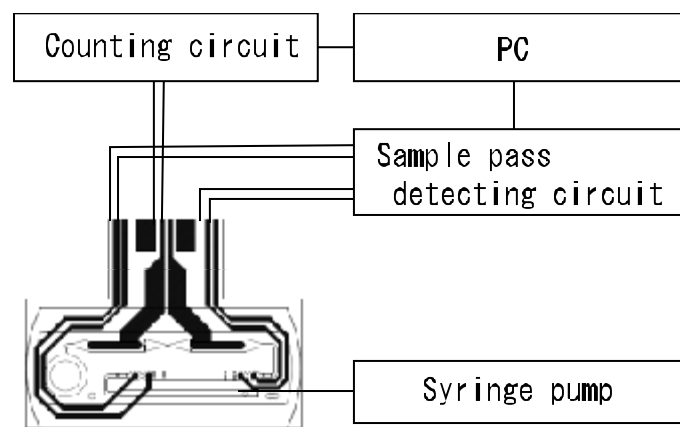


図 5-12 血球計数の測定系

Fig.5-12 Experimental set-up for red blood cell counting

5.5 実験結果および考察

5.5.1 コールター原理の検証

図 5-13 に赤血球が通過するときの高速度カメラの連続画像とそのときの電気抵抗パルスを示す。図 5-13(a)は赤血球がアパーチャを通過する直前であり、このタイミングに電気抵抗パルスが立ち上がり始めることが分かる。図 5-13(b)は、赤血球がアパーチャ中央を通過中の写真であり、このとき電気抵抗パルスがピーク値を取ることが分かる。図 5-13(c)は、赤血球がアパーチャを通過した直後であり、このとき電気抵抗パルスが立ち下がるということが分かる。これらの観察結果から、赤血球がアパーチャを通過するとき、電極間の抵抗値を経時連続的に測定することにより抵抗値パルスが検出できることが分かった。

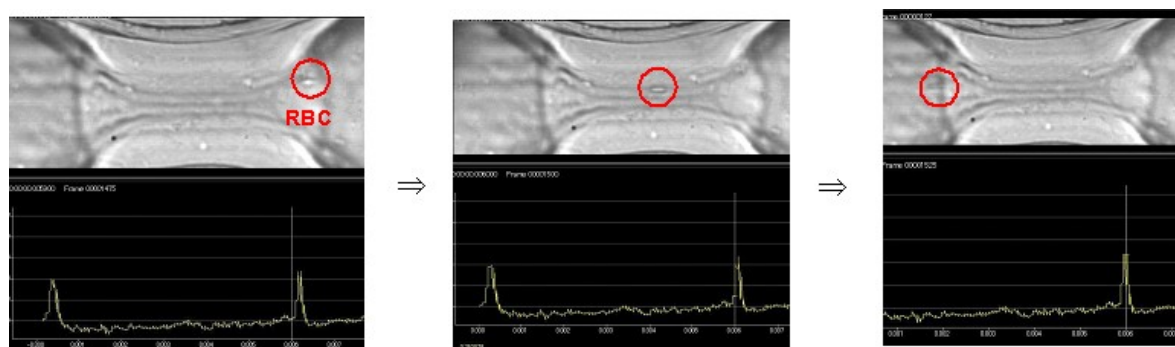


図 5-13 赤血球のアパーチャ通過と電気抵抗パルスの同期測定結果

Fig.5-13 Synchronous measurement of red blood cell's passing and electrical resistance pulse's generation

5.5.2 赤血球計数 試料液量一定化機構の検証

図 5-14 に赤血球計数測定 of 抵抗値パルスを示す。グラフの横軸は時間であり、縦軸は抵抗値である。

計数結果の平均値、それを希釈倍率から換算した全血中の赤血球数と 15 回の測定に対する変動係数を表 5-1 に示す。

表 5-1 赤血球計数の測定結果

Table.5-1 Measurement results of red blood cell counting

	Mean count of red blood cell (n=15)	Concentration of red blood cell in whole blood	Coefficient variance (n=15)
Coated device	10604	48.2 [$\times 10^5/\mu\text{L}$]	1.7 [%]
No coat device	10428	47.4	2.2
Conventional Counter	unknown	49.4	1.5

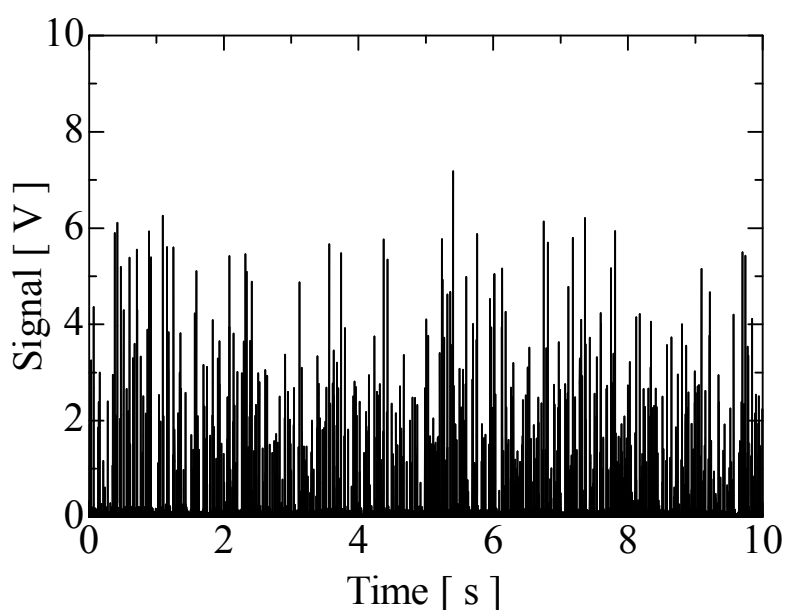


図 5-14 赤血球計数パルス

Fig.5-14 Signals obtained during the counting of red blood cells

表 5-1 に示す平均赤血球数は、15 回の計数測定結果の平均値であり、計量流路の容積である 22 μ L の赤血球分散液中に存在する赤血球の数である。また、全血中の赤血球濃度は、赤血球分散液が全血の 1 万倍希釈であること、および、計量流路の容積が 22 μ L であることから計算した全血 1 μ L あたりの赤血球数である。

5.3.1 試料液量の一定化で示した血球計測に供する試料の液量を一定とする手法の効果を評価するため、タンパク吸着抑制表面処理したマイクロコルターカウンタを用いたときの計数測定結果の精密性に注目した。表 5-1 に示す通り、タンパク吸着抑制表面処理したマイクロコルターカウンタを用いたときの変動係数は、1.7%であり、汎用の血球計数装置（SB-1420, アークレイ）では 1.5%であった。この結果から、試料液量一定化機構によって、本研究のマイクロコルターカウンタは、汎用血球計数装置と同等の精密性を有していると言える。

同様に、タンパク質吸着抑制表面処理の効果を評価するため、表面処理の有無と精密性の関係に注目した。表 5-1 に示す通り、表面処理有りでは変動係数が 1.7%であり、表面処理無しでは 2.2%であった。タンパク質吸着抑制表面処理により、精密度は 0.5%向上した。

次に、タンパク質吸着抑制表面処理の効果を評価するため、計数測定の正確性に注目すると、汎用血球計数装置の結果を真値と仮定して、タンパク質吸着抑制表面処理したマイクロコルターカウンタにおいて-2.4%、表面処理無しのマイクロコルターカウンタにおいて-4.0%の計数結果であった。計数測定結果が、表面処理の有無に関わらず真値より低い原因は、計量流路容積が設計値の 22 μ L よりも小さいことが考えられる。そして、表面処理無しのマイクロコルターカウンタの方が表面処理したマイクロコルターカウンタよりも計数測定結果が低いのは、赤血球が流路内壁に吸着することによって、アパーチャを通過しなかったためと考えられる。タンパク質吸着抑制表面処理によりマイクロコルターカウンタの正確度は、1.6%向上した。

5.6 結言

コールターカウンタをマイクロ流路で実現するための 2 つの課題、①計数する試料液量の一定化、②流路への血球付着を克服するため、①試料液のマイクロ流路内の通過を検知する 2 対の電極と一定容積の定量流路を組み合わせた試料液量一定化機構を備え、②プルロニックを用いたタンパク質吸着抑制表面処理を施したマイクロコールターカウンタを作製し、血液試料用いた評価によって、汎用の自動血球計数装置と同等の性能を有することを示した。

試料液量一定化機構は、複雑な流路構造を要せず、銀印刷電極シートのみを用いて実現できるため、製造コストが安価である。また、マイクロ流路への血球吸着を抑制するためのタンパク吸着抑制表面処理は、安価な界面活性剤を用い、表面処理液を塗布・乾燥させるだけの簡易な方法を用いることができる。更に、マイクロ流路と貫通孔のみから構成される構造を用いることにより安価に大量生産できる射出成形を製造法とすることが可能であり、かつ、電極シートは安価に大量生産の可能な印刷を製法とし、安価な銀インクと PDMS インクを材料とした。本研究のマイクロコールターカウンタは、製造コストを抑制することが可能であるため、使い捨て POCT デバイスに適した低コストのマイクロコールターカウンタを実現することができる。

以上のように、本研究のマイクロコールターカウンタは、汎用の自動血球計数装置と同等の性能を有し、かつ、製造コストを抑制することができるため、血液検査用の POCT デバイスに適用可能であると言える。

参考文献

- [1] W. H. Coulter, Means for counting particles suspended in a fluid, U.S. Patent 2,656,508, filed 1949 and issued 1953.
- [2] W. H. Coulter, High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer, Proceedings of National Electric Conference, Chicago, 12 (1956) 1034-1040.
- [3] M. D. Graham, The Coulter principle: Foundation of an industry, Journal of the Association for Laboratory Automation 8(6) (2003) 72-81.
- [4] H. Zhang, C. H. Chon, X. Pan, D. Li, Methods for counting particles in microfluidic applications, Microfluid Nanofluid 7 (2009) 739-749.
- [5] N. Takahashi, A. Aki, T. Ukai, Y. Nakajima, T. Maekwa, T. Hanajiri, Proposal and experimental validation of the electrophoretic Coulter method for analyzing microparticles and biological cells, Sensors and Actuators B 151 (2011) 410-415.
- [6] K. Roberts, M. Parameswaran, M. Moore, R. S. Muller, A silicone microfabricated aperture for counting cells using the aperture impedance technique, Proceedings of the 1999 Institute of Electrical and Electronics Engineers Canadian Conference (1999)
- [7] U. D. Larsen, G. Blankenstein, J. Branebjerg, M. Centret, Microchip Coulter particle counter, International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, (1997) 1319-22.
- [8] D. W. Lee, S. Yi, Y. H. Cho, A Flow Rate Independent Cell concentration measurement chip using electrical cell counters across a fixed control volume, Journal of Microelectromechanical Systems 17(1) (2008) 139-146.
- [9] 岩田博夫, バイオマテリアル, 共立出版 (2005)
- [10] 石原一彦, 山岡哲二, 畑中研一, 大矢裕一, バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人 (2003)

- [11] J. Sibarani, M. Takai, K. Ishihara, Surface modification on microfluidic devices with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers for reducing unfavorable protein adsorption, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 54 (2007) 88-93.
- [12] Ishihara K, Ziats NP, Nakabayashi N, Anderson JM, Protein adsorption from human plasma is reduced on phospholipid polymers, *Journal of biomedical materials research* 25 (1991) 1397-1407.

第 6 章 血球計数用集積化デバイス

6.1 緒言

本章では、本研究の目的である血球計数検査用 POCT (Point of care testing) デバイスを実現するため、第 2 章及び第 3 章において検討した計量機構及びマイクロミキサを集積化し、血球計数用の前処理デバイスを作製する。更に、前処理デバイス内の送液を制御する装置を作製し、前処理デバイスと送液制御装置を用いて血液の前処理を行い、その精密性を評価するとともに、前処理デバイス内における送液制御について考察する。また、これらを用いて前処理した血液試料を第 5 章において考案したマイクロコールターカウンタで計数計測し、POCT 用血球計数デバイスとしての有効性について考察する。

POCT 用デバイスは、通常、検査技師などの有資格者ではなく医師や看護師等、血液検体の取り扱いや装置・デバイスの取り扱いに不慣れな者が使用するため、熟練を必要とせず簡便に使用できる必要がある。また、血液検体によるデバイス使用者への感染、及び、デバイス間でのコンタミネーションを防止するため、ディスポーザブルであることが望まれる。

血液検査の作業工程は、採取した血液を測定に供することのできる状態にするための遠心分離操作及び希釈操作等からなる前処理工程、及び、前処理で調製した試料を用いた測定工程の二つに大別される。前処理工程と測定工程をそれぞれ正確に行わなければ、検査結果に誤差を生じるため、両工程共に専門的な知識と手技が求められる。従って、血液検査デバイスを誰もが簡便に取り扱えるようにするため、測定工程及び前処理工程をデバイス内で実行することが可能な集積化デバイスの実用化が求められる^{[1]-[3]}。

血球計数検査は、貧血、感染症の診断の他、心疾患リスクに対する有用な情報を与え、且つ、最も検査数の多い検査項目の一つである^{[4]-[6]}。現在、血球計数検査は、大病院の中央検査室や検査センターで大型の装置を用いて行われることが多い。しかし、これらの大型装置は、操作に熟練を要し、検査技師等の有資格者が取り扱う必要があるため、

近年、血球計数検査を小規模な医院等で行うための POCT 化が望まれている。血球計数検査の POCT 化により、採血から検査結果報告までに要する時間を短くし、医師が検査結果に基づいた即時診断を行うことを可能にするため^[7]、数多くの研究が報告されている^{[8][9]}。例えば、Roberts ら^[10]は、シリコンを材料とし、エッチングによって形成したマイクロ流路を用いたマイクロ血球計数デバイスを提案している。しかし、シリコンをエッチングで加工するという作製方法のため、製造コストが高く、また、血球計数計測をするための希釈等の血液の前処理は、デバイス外で行う必要がある。この他、Gawad ら^[11]は、ガラス-ポリイミドを材料としたマイクロ血球計数デバイスを、Trujillo ら^[12]は、PDMS (polydimethylsiloxane) とガラスを材料としたマイクロ血球計数デバイスを、Zheng ら^[13]は、パリレンと PDMS を材料としたマイクロ血球計数デバイスを提案している。これらは、シリコンのエッチング加工よりも製造コストが低い、希釈等の血液の前処理をデバイス外で行う点においては Roberts ら^[10]と同様である。一方、Rao ら^[14]は、血液の計量と溶血希釈からなる白血球計数用の前処理工程、及び、白血球計数計測を行うマイクロ血球計数デバイスを提案している。しかしながら、このデバイスでは、白血球のみを計数することが可能であり、赤血球の前処理及び計数を行うことができない。このように、血球計数検査の全ての前処理工程を集積化したデバイスの報告はなく、安価且つ集積化した血球計数用 POCT デバイスの実現が望まれている^[15]。

血球計数検査のための全ての前処理工程を集積化したデバイスの報告例が無いのは、前処理工程が複雑であるためと考えられる。血球計数検査では、赤血球計数のための 1 万倍以上の高倍率希釈、及び、白血球計数のための溶血希釈という二種類の前処理工程が必要である。赤血球計数用の前処理工程では、希釈率が 1 万倍以上と高倍率であるため、1 回の希釈では大量の希釈液を用いる必要があり、希釈液と血液を混合するための混合チャンバが大型化し、それに伴いデバイス全体が大型化するという問題がある。そこで、1 万倍以上に 1 度で希釈する方法に代えて、100 倍程度の希釈を 2 度に分けて行う二段階希釈が必要である。一方、白血球計数の前処理では、血液中に白血球の数

百倍の数の赤血球が存在する^[1]ため、数十倍程度の希釈と同時に赤血球を溶血（細胞膜の破壊）することが必要となる。

上述のように血球計数検査の前処理工程には、二段階希釈と溶血希釈の 2 つの工程が必要であり、これらをデバイス上で行うためには、集積化したマイクロ流路回路とマイクロ流路回路中の液体試料の流れを制御する送液制御技術が必要である。そして、集積化デバイスは、複数の機能を両立させるため、一本のマイクロ流路だけで構成することが困難であり、マイクロ流路が交差する部分において送液の方向を制御するためのバルブが必要となる。このように、集積化デバイス内での送液制御にバルブが必要となることから、近年、数多くのバルブが提案されている^[16]。例えば、Unger ら^[17]、および、Hansen ら^[18]は、PDMS 製のマイクロ流路を用い、PDMS の薄膜を用いたダイヤフラム型バルブを提案している。しかし、これらのバルブは、PDMS のように弾性を有する材料を用いなければならないという材料の制約があり、また、マイクロデバイス上にダイヤフラムを作製しなければならないことから、構造が複雑となり製造コストが高くなるという問題がある。この他、Rao ら^[14]は、図 6-1 に示すような回転移動式のバルブを提案している。しかしながら、回転時においても液体が漏れない精密なマイクロ流路を作製する必要があり、また、回転移動させるための装置機構が必要となることから、Rao らの方法の場合も製造コストが高くなるという問題がある。そこで、Leu ら^[19]は、ダイヤフラムや回転移動バルブのように可動する部分を有さず、マイクロ流路構造と表面の疎水性のみで機能する疎水性パッシブバルブを用いた集積化デバイスを提案している。しかし、デバイスの評価に用いる液体試料として色素水溶液を用いており、第 2 章で考察したタンパク質を含む生体試料を取り扱う際に問題となる逆流現象への対策は施されていないため、逆流現象を考慮したバルブの設計、及び、血液を試料とする評価が必要である。

本章では、血球計数検査に必要な二段階希釈及び溶血希釈の前処理を行う集積化デバイスと送液制御装置を作製し、血液を用いた評価実験によりその精密性を評価するとともに、集積化デバイス内における送液制御について考察する。また、前処理した血液試料を第 5 章で考

案したマイクロコールターカウンタで血球計数計測し、既存の自動血球計数装置と比較することにより、POCT デバイスとしての有効性について考察する。

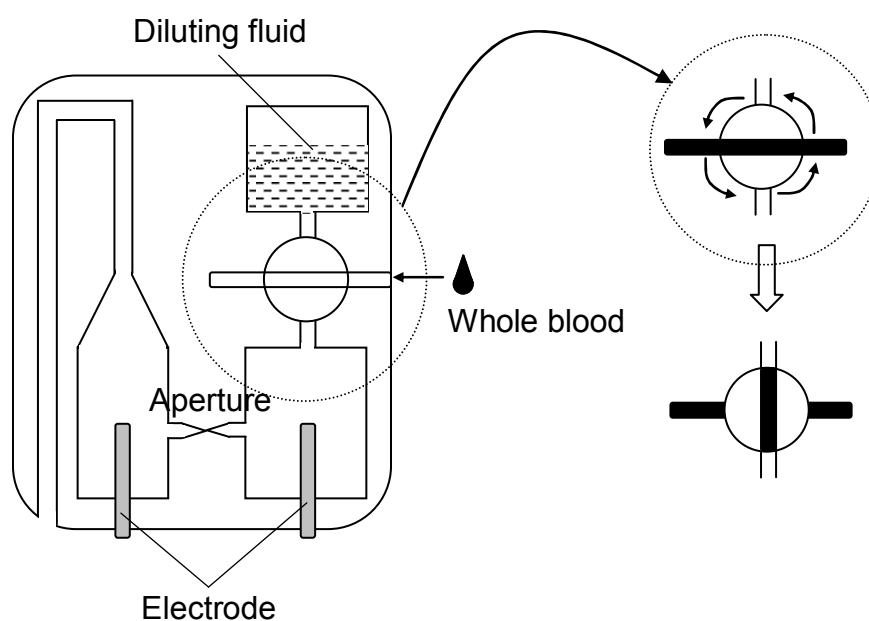


図 6-1 回転式バルブとそれを用いた白血球計数デバイス

Fig.6-1 Rotary valve and White blood cell counting device using the rotary valve

6.2 デバイスおよび装置の作製

6.2.1 前処理デバイス

赤血球計数用の二段階希釈及び白血球計数用の溶血希釈を血球計数の一連の前処理をデバイス上で行うため、2つの疎水性パッシブバルブ及び3つの混合チャンバを有する前処理デバイスを作製した。

前処理デバイスは、低コスト化を実現するため、安価なポリスチレンを材料として量産に適した射出成形法によって作製したマイクロ流路を、PDMSの自己粘着により封止し作製した。混合のための安価なステンレス（SU430）製の微小磁性ビーズを流路内に設けた混合槽に入れ、白血球の計数のための溶血希釈には溶血試薬を用いた。

図 6-2(a)に前処理デバイスのマイクロ流路成形品の写真を、図 6-2(b)にデバイス構造の立体図を示す。

前処理デバイスは、深さと巾の異なるマイクロ流路を有し、最も細い箇所は、巾 $50\mu\text{m}$ 深さ $50\mu\text{m}$ であり、最も太い箇所は、巾 $2000\mu\text{m}$ 深さ $2000\mu\text{m}$ である。また、前処理デバイスのマイクロ流路成形品は、10個の貫通孔（図 6-2(b)に白地で示す）を有し、これらは、血液を滴下するインレット、混合チャンバ及び送液制御装置と接続する空気孔である。

前処理デバイスは、疎水性パッシブバルブを有するため、疎水性を付与する表面処理が必要である。疎水化表面処理は、マイクロ流路成形品の疎水性パッシブバルブ部分にフッ素樹脂（n-ヘプタン）溶液 $1\mu\text{L}$ を滴下した後、室温環境下で乾燥させることによって行った。但し、疎水性パッシブバルブ部分以外も、マイクロ流路内壁への血液吸着によって毛管力が生成し、その結果、逆流を生じることが考えられたため、フッ素樹脂（n-ヘプタン）溶液を前処理デバイスの全てのマイクロ流路にスプレー塗布によってコーティングした後、室温環境下で乾燥し、全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスも併せて作製した。

前処理デバイスのマイクロ流路成形品を PET（Polyethyleneterephthalate）層と PDMS 層の2層からなるカバーシートに貼付ける方法について、図 6-3 に組立手順の模式図を示すとともに以下に説明する。図 6-3(a)は、前処理デバイスのマイクロ流路成形品とその他構成部品との

配置を示す立体図であり、図 6-3(b)～(d)は、組立の過程を示す断面図である。

始めに、溶血希釈のための溶血剤からなるドライ化試薬^{[20][21]}を形成するため、カバーシート上に 1.5%サポニンと、2.5%塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、及び、0.5%塩化セチルトリメチルアンモニウムを 10mM リン酸緩衝液に溶解した溶液（三峰性溶血剤溶液）^{[22][23]}10 μ Lを滴下し（図 6-3(b)参照）、40℃オーブン中で 2 時間乾燥させた（図 6-3(c)参照）。次に、マイクロ流路成形品とカバーシートを位置合わせ後に貼り付け、混合チャンバ内に混合用の直径 0.5mm のステンレス（SUS430）製磁性ビーズを挿入した（図 6-3(d)参照）。

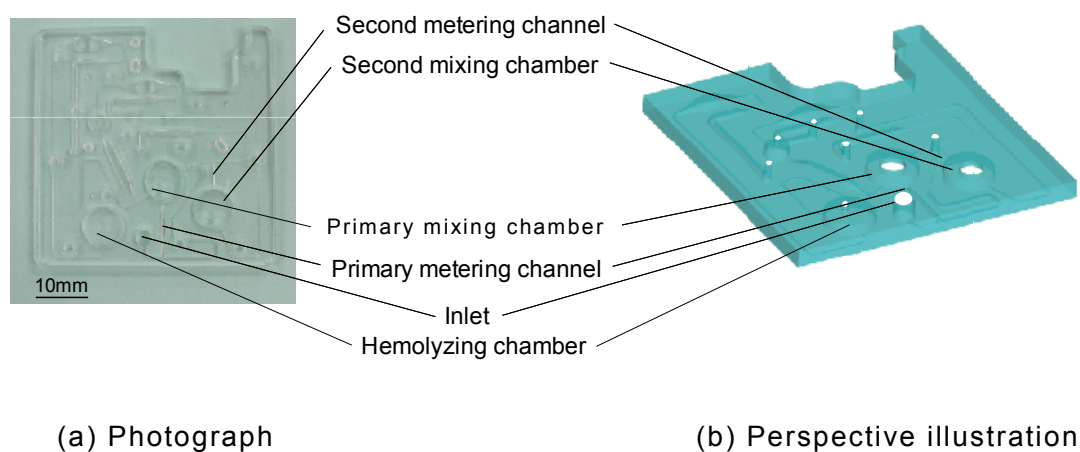


図 6-2 血球計数用前処理デバイス

Fig.6-2 Blood preparation device made of polystyrene and manufactured by injection molding

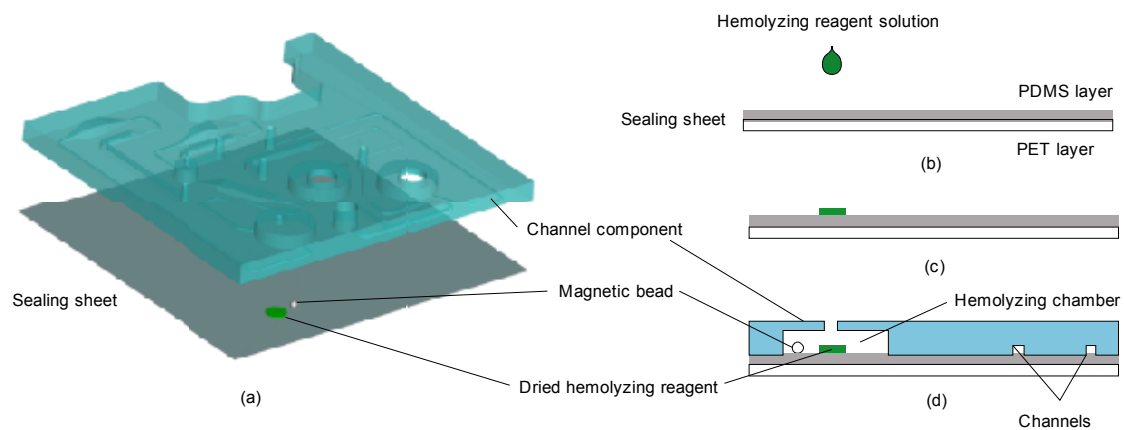


図 6-3 前処理デバイスの組立

Fig.6-3 Assembling procedure of the preparation device

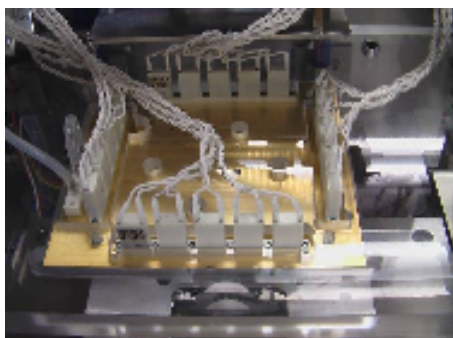
6.2.2 送液制御装置

送液制御装置は、空気を供給するシリンジポンプと空気孔を開閉する電磁バルブ及び送液制御装置を前処理デバイスに接続するインターフェースブロックから構成した。図 6-4(a)に装置の全体像の写真を示す。図 6-4(b)は、インターフェースブロックと前処理デバイスとの接触面の写真である。図 6-4(b)に示すように、インターフェースブロックの前処理デバイスとの接触面には、両者を気密に接続するため、シリコンゴム製の O リングを配置した。図 6-4(c)は、インターフェースブロックと前処理デバイスを接続した装置の断面図である。インターフェースブロックの O リングを配置した面を下向きとして、前処理デバイスに押し当てることにより、気密性を確保している。

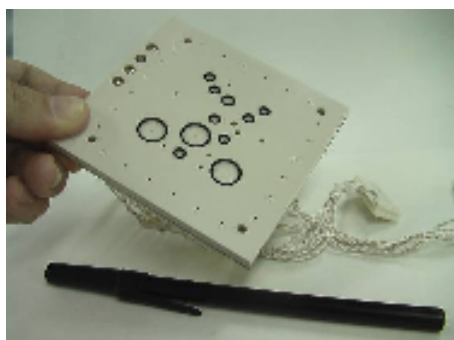
以下に第一希釈を例として前処理デバイス内の流体を制御する方法について示す。

図 6-5(a)に示すように、前処理デバイスの血液滴下口にオートピペットを用いて全血 5 μ L を滴下した後、前処理デバイスを送液制御装置に接続する。送液制御装置の電磁バルブを切り替えることにより、前処理デバイスの第一希釈出口と第一混合チャンバの空気孔を共に開くとともに、送液制御装置のシリンジポンプによりインレットから空気を供給することにより、第一計量流路に全血を充填することができる。更に、空気を供給し続けると、疎水性パッシブバルブ部では流れが止まる。一方、廃液流路方向へは血液が流れ続け、インレットの血液が無くなった後、図 6-5(b)に示すように、計量流路に血液を切り取ることができる。その後、送液制御装置から第一混合チャンバへ 50 μ L の希釈液を入れ、第一混合チャンバの空気孔を開くとともにアウトレットを閉じることで流路を加圧することを可能にした。

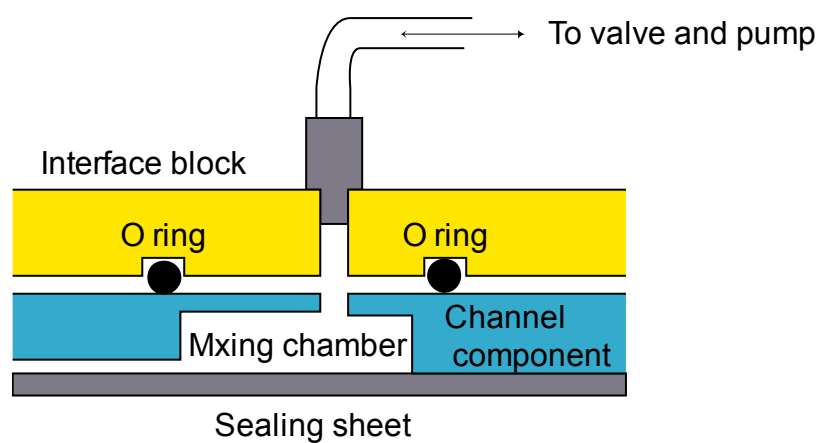
そして、インレットから計量流路中の血液に空気圧を加えることで、計量流路中の血液を混合チャンバに吐出した後、磁性ビーズを外部磁力によって回転し、混合チャンバ内で血液と希釈液を混合した（図 6-5(c)参照）。



(a) Fluid flow control system



(b) Interface block



(c) Cross-section of jointing the device and the interface block

图 6-4 送液制御装置
Fig.6-4 Fluid flow control system

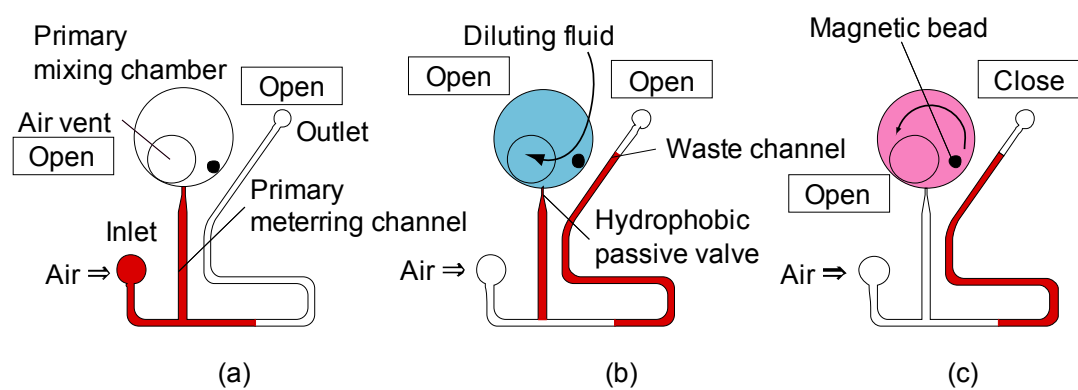


図 6-5 第一希釈における送液制御

Fig.6-5 A schematic of the primary dilution process in the preparation device

6.2.3 計数デバイス

血球の計数計測は、第 5 章で検討した図 6-6 に示すマイクロコルターカウンタを用いて行った。本章では、マイクロコルターカウンタを、以下、計数デバイスと呼ぶ。

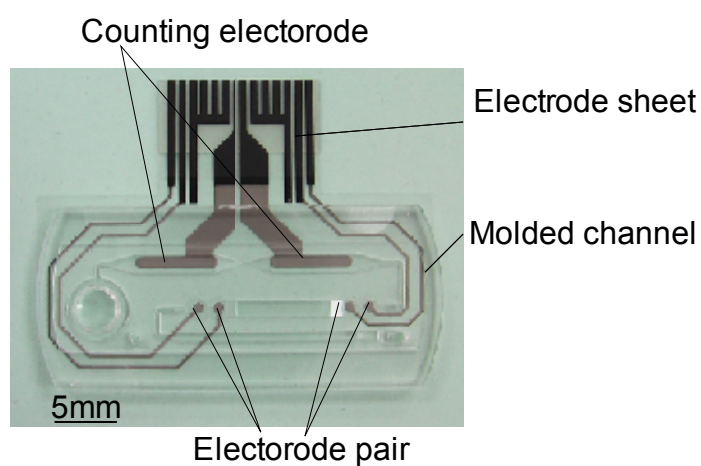


図 6-6 マイクロコルターカウンタ

Fig.6-6 Micro Coulter counter

6.3 実験

6.3.1 前処理デバイスの希釈再現性評価

第一及び第二希釈それぞれの希釈倍率の精密性を評価するため、疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイスと全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスを用い、第一希釈及び第二希釈における希釈倍率の再現性を検討した。

第一希釈において血液を希釈液で 25 倍に希釈する希釈倍率の再現性は、図 6-7 に示す希釈手順を用いて $2\mu\text{L}$ の全血を計量し、 $50\mu\text{L}$ の蒸留水で希釈した後、血液が蒸留水との浸透圧の違いで溶血して赤血球内から放出されるヘモグロビンの吸収ピーク波長である 542nm の吸光度を測定することで評価した。計量した全血量が一定であれば溶血希釈液の吸光度は一定となり、希釈後の混合液の吸光度を計測することにより、希釈倍率の再現性を評価することができる。そこで、本研究では、希釈及び吸光度測定の手続きを 15 回繰り返し行い、吸光度の変動係数を計算した。

前処理デバイスの全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した場合、第一希釈を行った希釈混合液の吸光度測定の結果を図 6-8 に示す。横軸は波長であり、縦軸は吸光度である。図には、吸光度が $500\text{--}600\text{nm}$ の範囲で 1nm 毎に測定を 15 回行った結果のスペクトルを示した。図 6-8 の 524nm にある吸収ピークはヘモグロビンであり、吸光度の変動係数は 0.60% であった。一方、前処理デバイスの疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した場合、吸光度の変動係数は 0.71% であった。

第二希釈において、400 倍に希釈する希釈倍率の再現性は以下の方法で評価した。

前処理デバイスの第一混合チャンバに 0.3% 青色 1 号色素・ 5% 血漿水溶液 $50\mu\text{L}$ をオートピペットで滴下し、第一希釈における第一計量流路への血液の分離と同様の方法で第二計量流路に $0.125\mu\text{L}$ の 0.3% 青色 1 号色素・ 5% 血漿水溶液を分離した。試料と希釈液の混合は、 $50\mu\text{L}$ の蒸留水を第二混合チャンバに入れた後、分離した 0.3% 青色 1 号色素・ 5% 血漿水溶液を第二混合チャンバに吐出するとともに微小磁性ビーズを回転させることによって行った。その後、希釈した混合液を用

い、青色1号色素の吸収ピーク波長である629nmの吸光度を測定した。

全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスを用いた場合の、550-700nmの吸光度スペクトルの測定結果を図6-9に示す。横軸は、波長であり、縦軸は吸光度である。629nmにおける吸光度の15回の測定結果の変動係数は、0.74%であった。一方、疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイスを用いたときの変動係数は、0.73%であった。

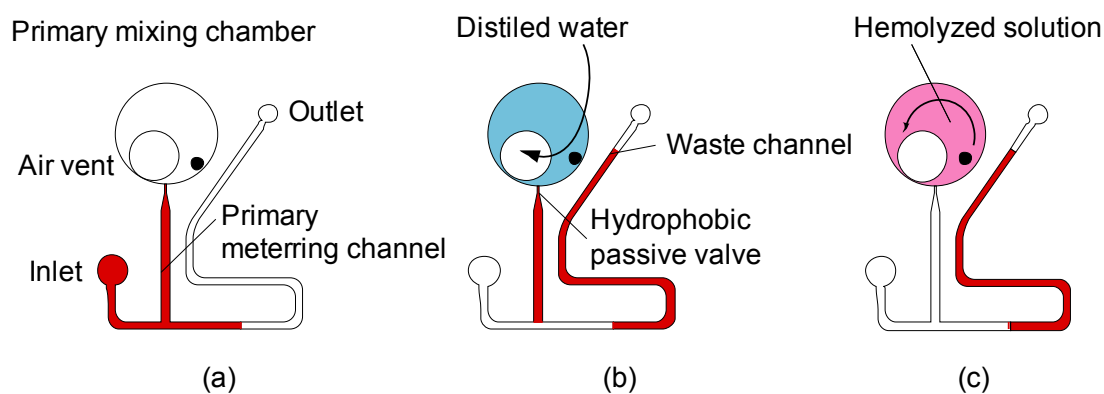


図 6-7 第一希釈の評価手順

Fig.6-7 A schematic of the primary dilution process in the preparation device

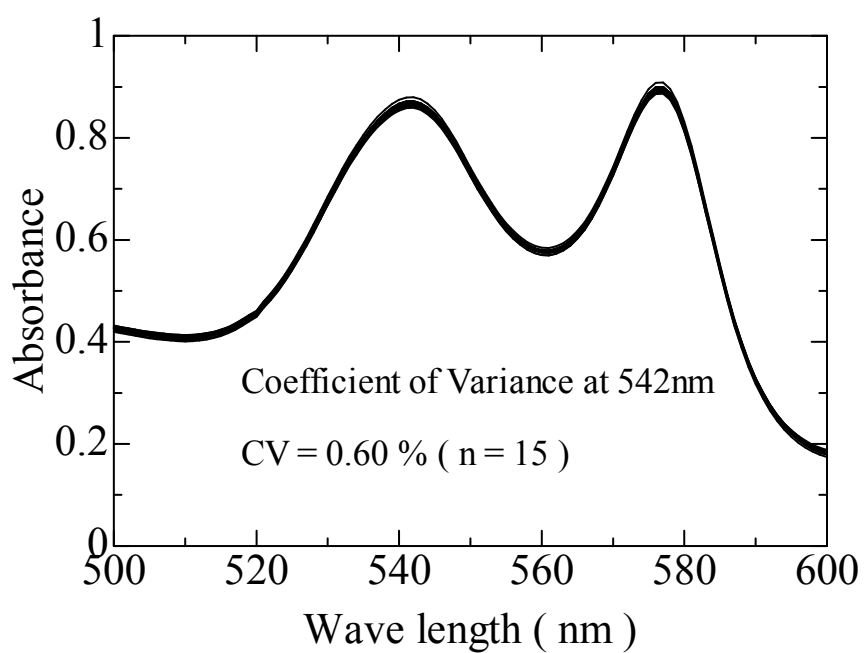


図 6-8 溶血希釈混合液のヘモグロビン吸収スペクトル

Fig. 6-8 Absorbance spectra of diluted whole blood

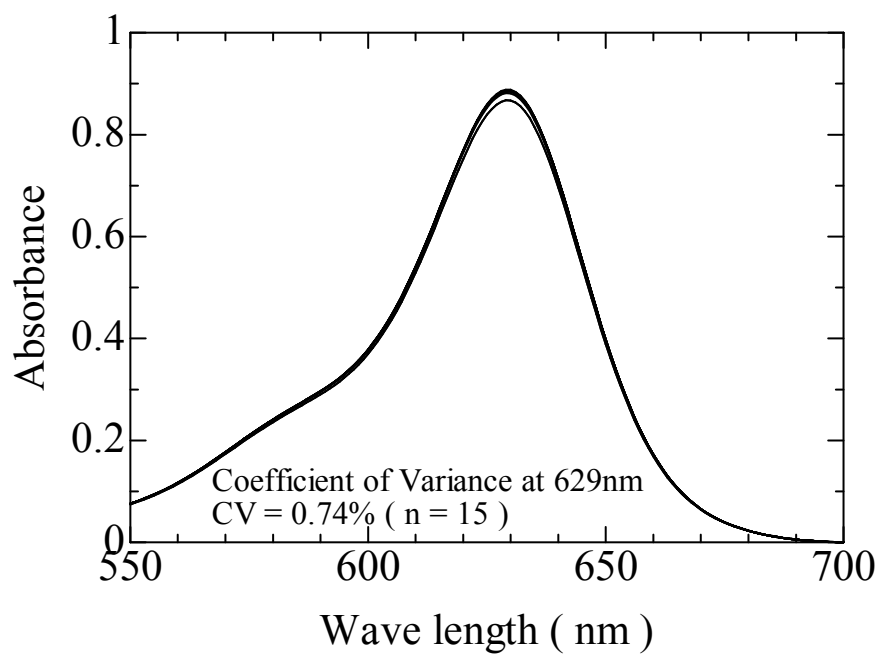


図 6-9 青色 1 号希釈混合液の吸収スペクトル

Fig. 6-9 Absorbance spectra of diluted Blue 1 dye solution

6.3.2 前処理デバイスと血球計数デバイスの総合評価

前処理デバイスと計数デバイスを組み合わせて使用したときの血球計数計測の精密性を評価するため、疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイスと、全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイス、及び、計数デバイスを用い、血球計数計測の再現性を検討した。

以下に評価手順を示す。

始めに、図 6-10(a)に示すように、前処理デバイスのインレットに 5 μ L の全血を滴下し、その後、送液制御装置と前処理デバイスを接続した（図 6-10(b)参照）。前処理デバイス内では、以下の測定シーケンスを実行した。

- 1) 第一計量流路への全血 2 μ L の分離
- 2) 第一混合チャンバへの 50 μ L の希釈液の供給
- 3) 計量した全血の第一混合チャンバへの吐出
- 4) 第一混合チャンバにおいて全血と希釈液の混合
- 5) 第二計量流路への第一希釈試料 0.125 μ L の分離
- 6) 第二混合チャンバへの 50 μ L の希釈液の供給
- 7) 計量した第一希釈試料 0.125 μ L の第二混合チャンバへの吐出
- 8) 第二混合チャンバにおいて第一希釈試料と希釈液の混合
- 9) 第二計量した残りの第一希釈試料の溶血チャンバへの移動
- 10) 溶血チャンバにおいて第一希釈試料とドライ化溶血剤（三峰性溶血剤）の溶解混合

上記のシーケンス終了後、前処理デバイスを送液制御装置から取り外し、第二混合チャンバから赤血球用の試料を採取して計数デバイスに滴下した（図 6-10(c)参照）。同様に、溶血チャンバから白血球用の試料を採取し、計数デバイスに滴下した（図 6-10(d)参照）。その後、それぞれの調製試料の赤血球数及び白血球数を計数デバイスを用いて計測した。これらの操作は、疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイス、及び、全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスを用い、それぞれ毎回新しいデバイスを用

いて 15 回繰り返した。

上述の評価の対照として評価に用いた血液の血球数を計測するため、汎用の血球計数装置（SB-1420, アークレイ）により計数計測した。計数計測の結果を表 6-1 及び図 6-11 にまとめて示す。

表 6-1 血球計数測定結果

Table.1 Measurement results of blood counting

	All-coated device	Partly-coated device	Conventional Counter
Items	Mean \pm SD (n = 15)	Mean \pm SD (n = 15)	Mean \pm SD (n = 15)
Erythrocyte (count/uL)	44.8 \pm 1.0 (* 10 ⁵)	49.6 \pm 9.6 (* 10 ⁵)	48.2 \pm 0.7 (* 10 ⁵)
Total leukocyte (count/uL)	48.7 \pm 1.4 (* 10 ²)	44.3 \pm 6.1 (* 10 ²)	51.1 \pm 1.1 (* 10 ²)
Ratio of Lymphocyte (%)	33.1 \pm 2.4	30.9 \pm 4.4	34.2 \pm 1.6
Ratio of Monocyte (%)	17.9 \pm 2.6	16.1 \pm 4.1	16.7 \pm 1.8
Ratio of Granulocyte (%)	49.0 \pm 2.7	53.0 \pm 4.9	49.1 \pm 1.7

15 回の赤血球及び白血球計数計測の結果から変動係数を計算した結果、疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイスを用いた場合には、赤血球，白血球計数計測の変動係数は、それぞれ 19.4, 13.8%であった。一方、全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスを用いた場合、赤血球，白血球計数の変動係数は、それぞれ 2.2, 2.9%であった。

全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスを用いた場合の変動係数は、臨床現場において求められる 3%未満を満たした。しかしながら、疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイスを用いた場合、変動係数は、3%未満を満たさず、全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスを用いた場合と比較して、それぞれ、17.2%, 10.9%増加した。

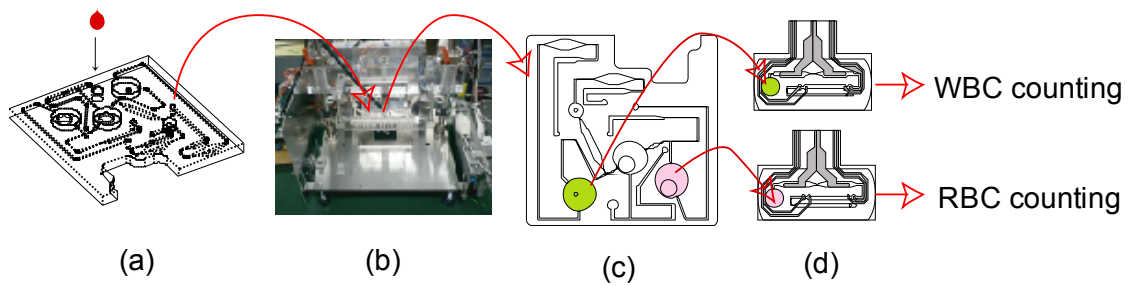
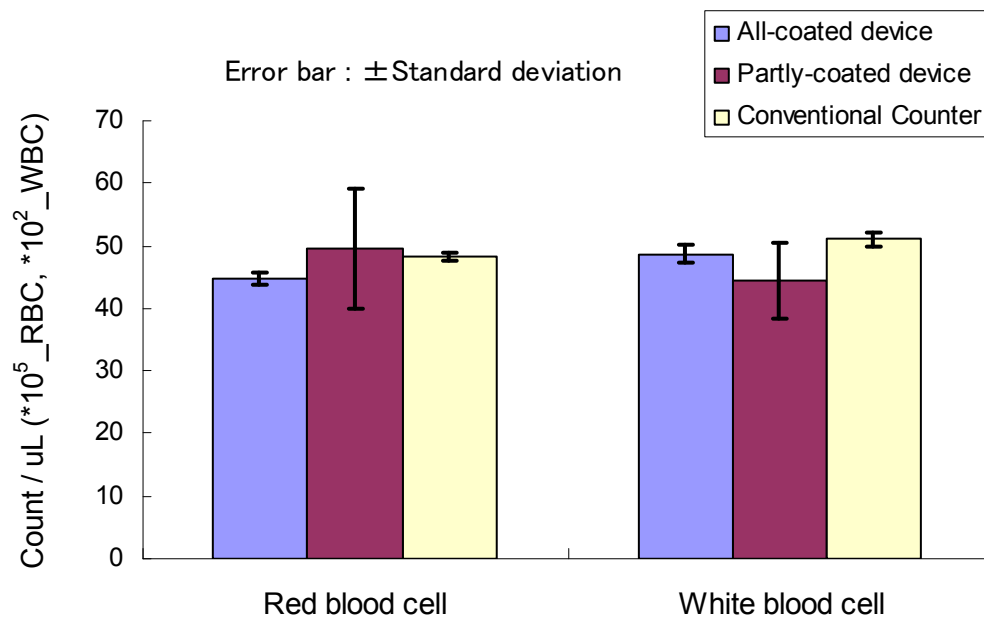
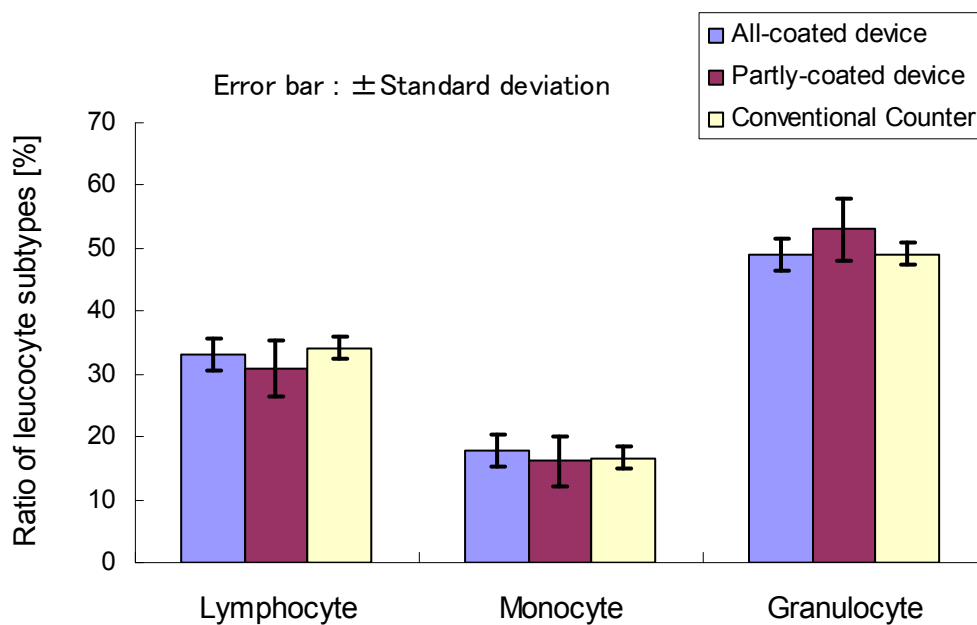


図 6-10 血球計数の再現性評価手順

Fig.6-10 Procedure of the evaluation of the resultant reproducibility



(a) Red blood cell and White blood cell count



(b) Ratio of leucocyte subtypes

図 6-11 赤血球および白血球計数の測定結果
Fig 6-11 Measurement results of blood cell counts

6.3.3 血球計数測定再現性不良の原因追求

前処理デバイスの第一計量流路と第一混合チャンバを用いた第一希釈、及び、第二計量流路と第二混合チャンバを用いた第二希釈、の変動係数は、疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した場合も全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した場合も、同等の結果であった。

一方、第一希釈と第二希釈及び溶血混合を同時に行う血球計数計測の評価において、血球、白血球計数の変動係数は、疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイスを用いた場合に増加した。これらの結果から、第一希釈及び第二希釈をそれぞれ単独に行う場合は、再現性に差が生じないが、第一希釈、第二希釈及び溶血希釈を同時に行う場合には、再現性が低下することが分かった。

この再現性低下の原因を検討するため、使用後の前処理デバイスの顕微鏡観察を行った。その結果、疎水性パッシブバルブ部分のみを表面処理した前処理デバイスにおいて、第一混合チャンバと溶血混合チャンバを結合するマイクロ流路、または、第一混合チャンバと第二計量流路を結合するマイクロ流路には、血液が残留していた（図 6-12 参照）。一方、全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスを使用後に顕微鏡観察したところ、残留血液を生じていなかった。

疎水性パッシブバルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイスを用い、第一希釈、第二希釈及び溶血希釈の送液操作を行い、前処理デバイス内における処理過程の様子を観察した結果、第一混合チャンバから第二計量流路に血液を移動し、マイクロ流路内の血液が空気で置換された後に、第一混合チャンバと第二計量流路を結合するマイクロ流路に第二計量流路に移動した血液が、2つの部分をつなぐ流路の角部に沿って戻る現象が見られた（図 6-13 参照）。マイクロ流路の両方の角部に沿って戻った血液はその後、流路内で図 6-14 に模式的に示す様に合わさり、その後流路を塞ぐ現象が生じた。この現象は、血液を送っている空気圧を変化させても生じた。また、同様の現象は、第一混合チャンバから溶血混合チャンバの間のマイクロ流路でも計測された。

血液を流した後の流路の顕微鏡写真を図 6-15 に示す。疎水性パッシ

バルブ部分のみを疎水化表面処理した前処理デバイスでは、送液制御装置で前処理を行った後のマイクロ流路の端部に多くの赤血球が残り（図 6-15 (a)参照）、一方、全てのマイクロ流路を疎水化表面処理した前処理デバイスでは、マイクロ流路端部に局在する赤血球は観察されなかった（図 6-15 (b)参照）。

血液がマイクロ流路矩形断面の角部を伝って流れるのは、血液の通過によりマイクロ流路内壁面に血液が吸着して親水化した結果、マイクロ流路矩形断面の角部が毛管として働いたと考えられる。すなわち、マイクロ流路矩形断面の角部において、2 面が親水化したマイクロ流路内壁からなり、1 面が空気からなる三角形の断面を持つ毛管が形成され、血液の流れが生じた。この血液の流れは、マイクロ流路断面の全てを通るのではなく角部のみを通るため、角部以外の部分を空気が通過することができる。従って、送液制御装置によってマイクロ流路内に空気圧の差を生じさせても、マイクロ流路矩形断面を伝った血液の流れを止めることができない。この混合チャンバから結合する流路への流れが生じるため、混合チャンバ内の血液量が減少し、その結果、希釈率に変動が生じたと考えられる。第一希釈のみ、及び、第二希釈のみを行う場合には、第一混合チャンバと溶血混合チャンバを結合する流路を用いないため、再現性が低下しなかった。しかし、第一希釈と第二希釈及び溶血希釈を同時に行う場合には、混合チャンバから結合する流路への血液の流れが生じ、混合チャンバ内の血液量が減少した結果、血液の希釈率に誤差が生じ、再現性が低下したと考えられる。

本研究の前処理デバイスは、マイクロ流路内に物理的に流れを止めるバルブ構造を有するものではなく、平面的な構造の疎水性パッシブバルブと空気圧を利用して送液を制御していることから、空気圧に依存しないマイクロ流路矩形断面の角部を伝った毛管力による流れを物理的に止めることができない。従って、疎水性パッシブバルブを用いた集積化デバイスを用いる場合、血液吸着による毛管力の生成を防止する必要がある。

本研究において、フッ素樹脂を用いた疎水化表面処理を全てのマイクロ流路に適用することにより、血液吸着による毛管力の生成を防止することが可能であり、高い再現性の血球計数計測が可能であった。

このことから、フッ素樹脂を用いた疎水化表面処理は、毛管力の生成を防止する手段として有効であり、集積化デバイス内の送液制御が可能であることが分かった。

作製したデバイス及び送液制御装置は、臨床検査で求められる血球計測の再現性の変動係数 3%を満足することができた。



図 6-12 流路に残留した試料の顕微鏡写真

Fig.6-12 Microscope photograph of sample plug in the microchannel of the used partially coated device

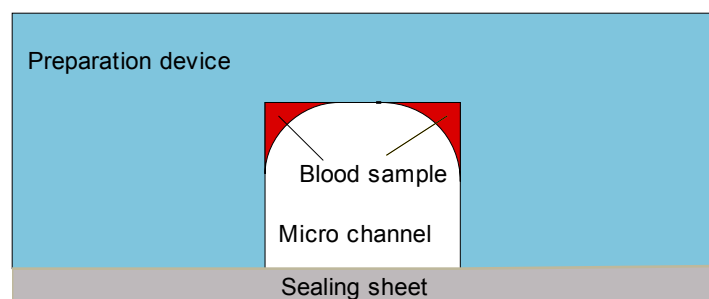


図 6-13 マイクロ流路矩形断面の角部を流れる血液
 Fig.6-13 Blood flowing at microchannel's corners

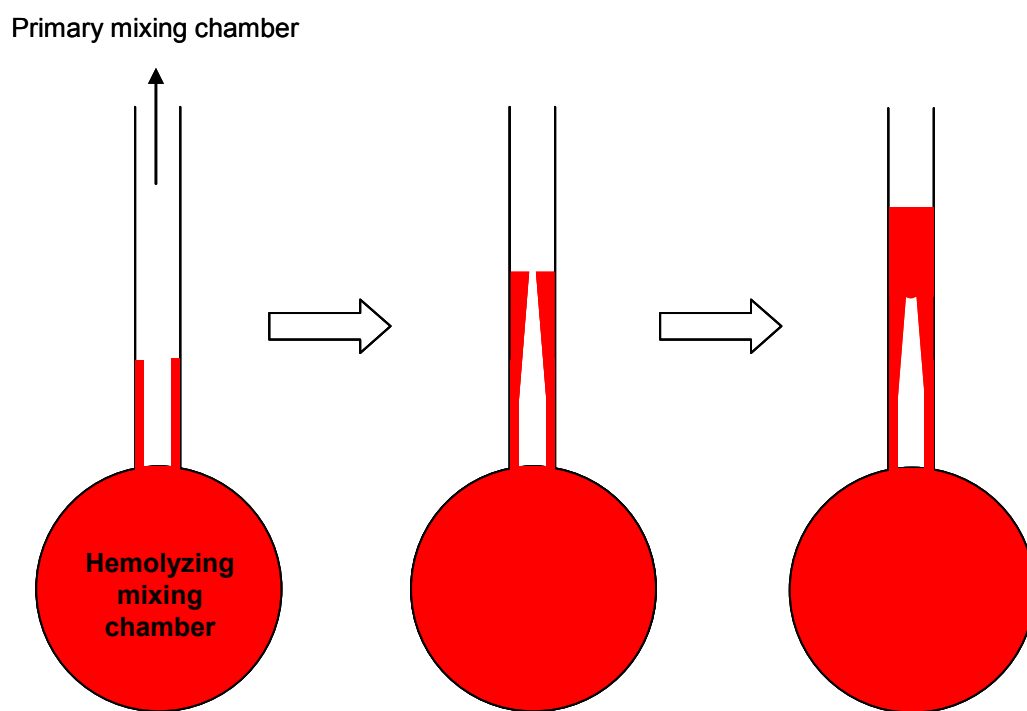
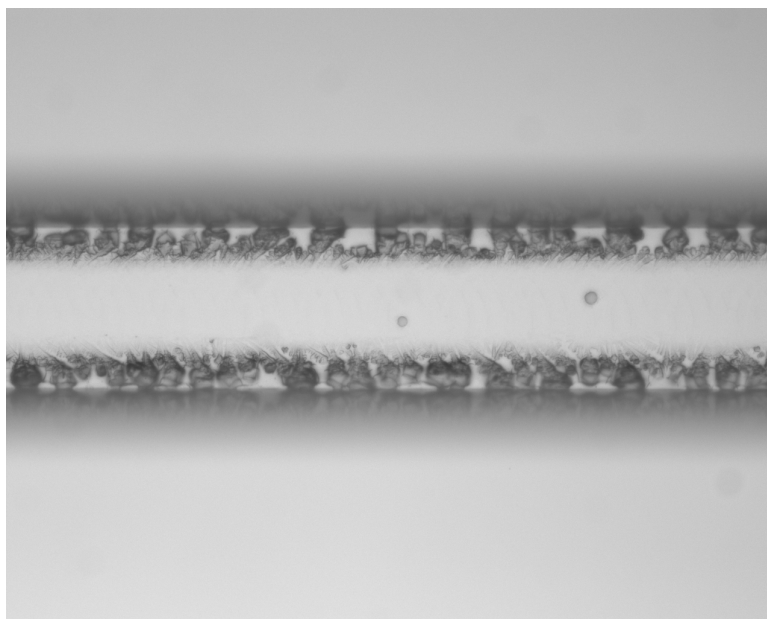
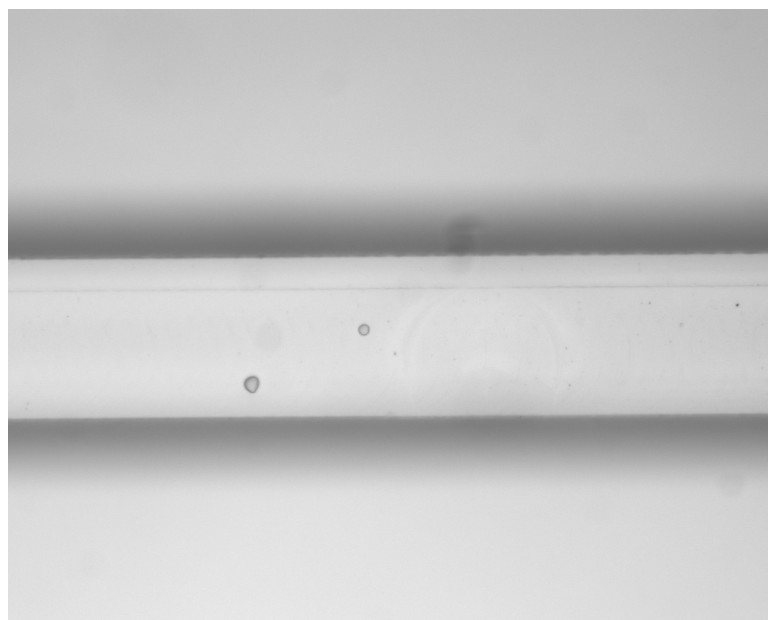


図 6-14 角部を流れる血液が合わさる現象の模式図
 Fig.6-14 Schematic illustration of combining blood flowing at
 microchannel's corners



(a) Partially coated device



(b) All-coated device

図 6-15 使用後デバイスの流路の顕微鏡写真

Fig. 6-15 Microscopic images of the channels from used devices

6.4 結言

本章では、前章までに検討した計量、混合及び表面処理を用い、射出成形で作製した平面的なデバイス上に血球計数の一連の前処理、すなわち、二段階希釈と溶血希釈を集積化した前処理デバイスを作製するとともに、空気供給とデバイス空気孔の開閉を行う前処理デバイス内の送液制御装置を作製した。そして、前処理デバイスと送液制御装置を用いて前処理した血液試料を第5章で考案したマイクロコルターカウンタで血球計数計測し、臨床現場で求められる変動係数3%を下回る信頼性の高い血球計測が可能であることを示した。更に、フッ素樹脂を用いた疎水化表面処理による流路内壁への血液吸着抑制が、前処理デバイス内での毛管力による血液試料の流れを防止し、精密性の高い送液制御を可能とすることを示した。

第1章で述べたとおり μ TAS デバイスを POCT に適用するためには、

- ①信頼性（検査結果の再現性）
- ②簡便性（使い易さ）
- ③コスト

の3つの課題を個別にではなく同時に解決することが必要である。

本研究の血球計数デバイスは、臨床現場で求められる変動係数値を満たし、①信頼性（検査結果の再現性）の課題を解決した。また、従来マイクロデバイス上では実現されなかった血球計数のための血液試料の前処理を可能とし、前処理デバイス内の送液制御を行う装置との組合せ使用によって前処理を自動化することによって、②簡便性（使い易さ）の課題を解決した。更に、低コストに大量生産可能な製造方法である射出成形で作製可能な平面的なマイクロ流路のみでデバイスを構成し、デバイス材料として低コストのポリスチレンを用い、マイクロ流路とカバーシートの接合に PDMS の自己粘着性を利用した接着剤不要の方法を用い、印刷で作製可能な電極シートを用い、簡易な表面処理方法を考案することにより、③コストの課題を解決した。即ち、本研究は、 μ TAS デバイスを POCT に適用するための3つの課題を同時に解決し、血球計数検査の POCT 化を可能とした。

参考文献

- [1] S. S. Ehrmeyer, R. H. Laessig, Quality in point-of-care testing: what drives the system personnel, regulatory standards, or instrumentation?, *Accreditation and Quality Assurance* 10 (2004) 47-51.
- [2] J. H. Nichols, Quality in point-of-care testing: taking POC to the next level, *Accreditation and Quality Assurance* 11 (2006) 273-277.
- [3] M. Biehl, T. Velten, Gaps and Challenges of Point-of-Care Technology, *IEEE Sensors Journal*, 8(5) (2008) 593-600.
- [4] R. Hoffman, E. J. Benz Jr., S. J. Shattil, B. Furie, H. J. Cohen, L. E. Silberstein, P. MoGlave, *Hematology: Basic Principles and Practice*, fourth ed., Churchill Livingstone, 2004.
- [5] B. D. Horne, J. L. Anderson, J. M. John, A. Weaver, T. L. Bair, K. R. Jensen, D. G. Renlund and J. B. Muhlestein, Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk?, *Journal of the American College of Cardiology* 45(10) (2005) 1638-1643.
- [6] J. W.G. Yarnell, I. A. Baker, P. M. Sweetnam, D. Bainton, J. R. O'Brien, P. J. Whitehead and P. C. Elwood, Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease, *Circulation* 83 (1991) 836-844.
- [7] H. Zhang, C. H. Chon, X. Pan, D. Li, Method for counting particles in microfluidic applications, *Microfluid Nanofluid* 7 (2009) 739-749.
- [8] C. Yi, C. W. Li, S. Ji, M. Yang, Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells, *Analytica Chimica Acta* 560 (2006) 1-23.
- [9] O'Brien T, Griffiths R, Eisenberg P, Popper C, Robinson J., Impact of point of care STAT CBC on turnaround time for test results and duration of visit in a managed care outpatient center: evidence from a randomized controlled trial., *Annu Meet Int Soc Technol Assess Health Care Int Soc Technol Assess Health Care Meet* (1996) 12:53.

- [10] K. Roberts, M. Parameswaran, M. Moore, R. S. Muller, A silicon microfabricated aperture for counting cells using aperture impedance technique, Proceedings of the 1999 IEEE Canadian conference on electrical and computer engineering (1999) 1668-1673.
- [11] S. Gawad, L. Schild, Ph. Renaud, Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing, Lab on a Chip 1 (2001) 76-82.
- [12] R. R. Trujillo, O. C. Fernandez, M. Garrido, M. Arundell, A. Valencia, G. Goñi, High-speed particle detection in a micro-Coulter counter with two-dimensional adjustable aperture, Biosensors and Bioelectronics 24(2) (2008) 290-296.
- [13] S. Zheng, M. Liu, Y. C. Tai, Micro coulter counters with platinum black electroplated electrodes for human blood cell sensing, Biomed Microdevices 10 (2008) 221-231.
- [14] L. V. Rao, B. A. Ekberg, D. Connor, F. Jakubiak, G. M. Vallaro, M. Snyder, Evaluation of a new point of care automated complete blood count analyzer in various clinical settings, Clinica Chimica Acta 389 (2008) 120-125.
- [15] D. Irimia, Cutting edge: Electronic counting of white blood cells, Lab on a Chip 9 (2009) 2875-2876.
- [16] K. W. Oh, C. H. Ahn, A review of microvalves, Journal of micromechanics and microengineering 16 (2006) R13-R39.
- [17] M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S. R. Quake, Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography, Science 288(113) (2000) 113-116.
- [18] C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger, S. R. Quake, A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(26) (2002) 16531-16536.
- [19] T. S. Leu, P. Y. Chang, Pressure barrier of capillary stop valves in micro sample separators, Sensors and Actuators A 115 (2004) 508-515.

- [20] S. Toda, T. Sakata, Y. Hamaguchi, Reagent for simultaneous determination of hemoglobin and leukocytes in blood, U.S. Patent, 1993, Patent No. 5,250,437
- [21] W. Burgi, H. R. Marti, Automated blood count analysis by trimodal size distribution of leukocytes with the SYSMEX E-5000, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 27 (1989) 365-368.
- [22] B. Waiter, Dry reagent chemistries in clinical analysis, *Analytical Chemistry* 55(4) (1983) 498A-514A
- [23] A. Zipp and W. E. Hornby, Solid-phase chemistry: its principles and applications in clinical analysis, *Talanta* 31(10B) (1984) 863-877.

第 7 章 結言

7.1 本論文の結論

μ -TAS (Micro Total Analysis Systems) を用いた POCT (Point of care testing) 用血液検査デバイスは、医療サービスの向上を生み出すものとして期待されている。しかしながら、臨床検査の現場に受け入れられる実用的な POCT 用 μ TAS デバイスは実現されていないのが現状である。

μ TAS が POCT デバイスとして臨床検査の現場に受け入れられるための課題は、①信頼性 (検査結果の再現性)、②簡便性 (使い易さ) 及び③コストの 3 つである。

これら 3 つの課題を解決するため、以下に挙げる要件を満たすことが必要である。

- ① 信頼性 (検査結果の再現性) の課題に対しては、タンパク質及び脂質等の複雑な成分を含み、単なる水溶液と粘性、表面張力等が異なり、タンパク質による界面活性作用を有する血液を水溶液同様に精密に再現よく取り扱えること
- ② 簡便性 (使い易さ) の課題に対しては、デバイス使用者の手技及び負担を不要とするための検査工程を集積化されていること
- ③ コストの課題に対し、安価な材料、安価な製造法で作製可能な単純な構造のデバイスであること

そこで本論文では、最も検査数の多い血球計数検査を対象として、血液試料を再現良く取り扱うための 2 種類の表面処理法を考案し、安価な材料・製法で作製可能な平面的なマイクロ流路のみで構成した血球計数検査の前処理工程を集積化したデバイスに適用した。

さらに、デバイス内の送液制御装置及び血球計数計測を行う計数デバイスを作製し、表面処理が集積化デバイス内における流体制御に及ぼす影響について考察するとともに、血液を試料とする評価によりその有用性を示した。

第 1 章では本論文の緒論として、 μ TAS を POCT 用血液検査デバイスへ適用する試みが必ずしも成功していない状況を述べた後、血液とい

う特異な性質を有する試料を対象としながら、既存の血液検査装置との比較において競争力のあるデバイスを構築するための課題について考察した。

第2章では、血球計数検査のための血液の希釈前処理に必要な計量機構の実現を目的とし、フッ素樹脂を用いた疎水化表面処理を施すことにより、平面的なマイクロ流路のみで構成できる疎水性パッシブバルブを微量の血液を計量及び吐出するマイクロディスペンサとして使用可能であることを示した。

射出成形によってポリスチレン製のマイクロ流路を作製し、フッ素樹脂を表面処理剤とした表面処理を用いることにより、200nLの血漿溶液を計量・吐出可能なマイクロディスペンサを作製し、血液を用いた吐出量の評価により、その有効性を示した。さらに、フッ素樹脂表面処理は、ポリスチレン表面に疎水性を付与するだけでなく、血液の流路内壁への吸着を抑制する効果があり、これにより、血液の吸着による毛管力の生成で引き起こされる逆流現象を抑制できることを示した。また、逆流現象を抑制可能な表面処理を選択する評価指標として接触角の繰り返し測定を用い、拡張前進角と滑落角を用いたマイクロディスペンサの吐出圧力の推定法を提案するとともに、用いた評価指標と吐出圧力の推定方法の有効性を示した。

第3章では、血球計数検査のための血液の希釈前処理に必要なマイクロミキサの実現を目的とし、射出成形品と樹脂シートと微小磁性ビーズから構成した簡易な構造のマイクロミキサを作製し、作製したマイクロミキサが、血球計数用POCTデバイスに適用できる実用的な性能を有することを示した。さらに、混合チャンバの壁に厚みの異なる突起を有する質量分布マイクロミキサを提案し、FEM解析によって予想した振幅分布が、設計に基づいて作製したマイクロミキサの振幅分布に一致することを示した。考案したマイクロミキサの混合性能は、蛍光粒子溶液を用いて評価を行い、効果的に混合が行えることを示した。

第4章では、血球計数検査の誤差要因となるマイクロ流路内壁への血球吸着を防止する表面処理の実現を目的とし、ポリスチレン製のマイクロ流路内壁への血液吸着を抑制する両親媒性の界面活性剤プルロ

ニックを表面処理剤とした表面処理方法を提案した。提案した表面処理方法に対して、蒸留水及び血漿水溶液を用いた接触角の測定と血液を用いた吸着評価及び蛍光標識タンパク質を用いた吸着量評価実験により、疎水基が長くかつ疎水基の割合が高い分子構造を有するプルロニックが、処理時間 10 分という短時間の浸漬処理のみで効果的に血液吸着を抑制できることを示した。さらに、プルロニックの分子構造によるタンパク質吸着抑制性能の違いが、疎水結合によるポリスチレン表面へのプルロニック分子の残留効率の違いから生ずることについて考察した。

第 5 章では、血球計数計測を行うコールターカウンタをマイクロ流路で実現することを目的とし、ポリスチレンを材料としたマイクロ流路と印刷シート電極を用いた安価なマイクロコールターカウンタを作製した。さらに、計数する試料液量を一定化する方法を考案し、考案した機構を有するマイクロコールターカウンタに第 4 章で考案した血球付着を防止する表面処理、及び、気泡生成を抑制する電極への親水化表面処理を施すことにより、臨床検査の実用に耐える正確性及び精密性を備えるマイクロコールターカウンタが実現できることを示した。

第 6 章では、血球計数検査用 POCT デバイスの実現を目的とし、第 2 章及び第 3 章において検討した計量機構及びマイクロミキサを集積化し、血球計数用の前処理デバイスを作製した。さらに、前処理デバイス内の送液を制御する装置を作製し、前処理デバイスと送液制御装置を用いて血液の前処理を行い、その精密性を評価するとともに、前処理デバイス内における送液制御について考察した。そして、作製したデバイス及び装置を用いた評価の結果、臨床検査で求められる再現性の変動係数 3%を満たす信頼性の高い血球計測が可能であることを示した。また、フッ素樹脂を用いた疎水化表面処理による全てのマイクロ流路内壁への血液吸着抑制により、前処理デバイス内での毛管力の生成による血液の流れを防止し、精密性の高い送液制御を可能にした。

本研究の血球計数デバイスは、臨床現場で求められる変動係数値を満たし、①信頼性（検査結果の再現性）の課題を解決した。また、従来マイクロデバイス上では実現されなかった血球計数のための血液試

料の前処理を可能とし、前処理デバイス内の送液制御を行う装置との組合せ使用によって前処理を自動化することにより、②簡便性（使い易さ）の課題を解決した。さらに、低コストに大量生産可能な製造方法である射出成形で作製可能な平面的なマイクロ流路のみでデバイスを構成し、デバイス材料として低コストのポリスチレン、マイクロ流路とカバーシートの接合に PDMS の自己粘着性を利用した接着剤を使わない方法、及び、印刷で作製可能な電極シートを用い、簡易な表面処理方法を考案することにより、③コストの課題を解決した。即ち、本研究は、 μ TAS デバイスを POCT に適用するための 3 つの課題を同時に解決し、血球計数検査の POCT 化を可能とした。

本論文に関連する公表論文

学術論文

- [1] Yuichiro Noda, Takaaki Suzuki, Isaku Kanno, Masahiro Hanafusa, Akihiro Yamamoto, Moeko Ijuin, Masaki Hori, Takashi Osumi and Hidetoshi Kotera, “Polystyrene Microdispenser for Blood Tests Using Hydrophobic Passive Valve”, *Sensors & Actuators: A. Physical* 169 (2011), pp.274-281. (第 2 章)
- [2] Yuichiro Noda, Kensuke Kanda, Takaaki Suzuki, Isaku Kanno, and Hidetoshi Kotera, “A Micromixer utilizing Resonance Frequency Mode Modulation on Meta-Structure”, 投稿予定. (第 3 章)
- [3] Yuichiro Noda, Masahiro Hanafusa, Akihiro Yamamoto, Moeko Ijuin, Masaki Hori, Takashi Osumi, Takaaki Suzuki, Isaku Kanno and Hidetoshi Kotera, “Integrated blood cell counting device using a hydrophobic surface treatment”, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 171-172 (2012), pp.1321-1326 (第 6 章)

学術講演

- [1] Yuichiro Noda, Takaaki Suzuki, Isaku Kanno and H. Kotera, “Polystyrene Microdispenser for Blood Tests Using Hydrophobic Passive Valve”, *Technical Digest of The 5th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro-Nano Technology*, p.100, 2010/7/6-9, Perth, Australia. (第 2 章)
- [2] 神田健介, 野田雄一郎, 鈴木孝明, 神野伊策, 小寺秀俊, 質量分布型マイクロミキサー, 日本機械学会 2008 年度年次大会, Vol.8, pp.35-36, 2008/8/3-7, 横浜国立大学 (神奈川県横浜市) (第 3 章)
- [3] Yuichiro Noda, Takaaki Suzuki, Isaku Kanno and H. Kotera, “Surface modification of Polystyrene by PEO/PPO block copolymer Pluronic to prevent blood adhesion”, *Technical Digest of The 5th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro-Nano Technology*, p.128, 2010/7/6-9, Perth, Australia. (第 4 章)

- [4] Yuichiro Noda, Takaaki Suzuki, Isaku Kanno and H. Kotera, “A Fully-Integrated complete blood count (CBC) chip for POCT”, Technical Digest of The 5th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro-Nano Technology [APCOT2010], p.99, 2010/7/6-9, Perth, Australia. (第 6 章)

特許

- [1] 野田雄一郎, 「カートリッジ」, 日本国特許第 4660662 号.
(第 2, 3, 6 章)
- [2] 野田雄一郎, 松本大輔, 白木裕章, 「分析装置用カートリッジ」,
日本国 特開 2007-3414, カナダ国 CN 10/1203763,
欧州 EP 1898222, 米国 US 2009/123337,
国際出願 WO 2006/137431, いずれも審査中. (第 2, 3, 5, 6 章)
- [3] 小寺秀俊, 鈴木孝明, 神田健介, 野田雄一郎, 「液体攪拌方法、液体攪拌システム、およびカートリッジ」,
日本国 特許 4980465 号
国際出願 WO 2009/119918, カナダ国 CN 10/1980769,
欧州 EP 2260934, 米国 US 2011/019497, 日本国以外は審査中.
(第 3 章)
- [4] 野田雄一郎, 「送液方法、およびこれに用いるカートリッジ」,
日本国特許 4942662 号
米国特許 USP 8172455
国際出願 WO 2007/049534, カナダ国 CN 10/1297200,
欧州 EP 1942347, 日本国及び米国以外は審査中.
(第 6 章)

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇切な御指導，御鞭撻を賜りました京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻 小寺秀俊教授に心より感謝申し上げます。また、多くの貴重な御助言と御指導を賜りました京都大学大学院工学研究科機械理工学専攻 中部主敬教授ならびに京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 岩田博夫教授に深く感謝いたします。

神戸大学大学院工学研究科機械工学専攻 神野伊策教授には、研究の遂行にあたり貴重な御助言と御指導をいただきましたこと、心より厚く御礼を申し上げます。また、香川大学工学部知能機械システム工学科 鈴木孝明准教授には、動的接触角実験に御協力をいただきますとともに論文をまとめるにあたり御懇切な御指導と御助言をいただきましたこと、深く感謝いたします。さらに、質量分布ミキサを共同研究し、実験結果等を快く提供していただいた兵庫県立大学大学院工学研究科電気系工学専攻 神田健介助教に深く感謝いたします。

本研究の遂行に深い御理解と御支援を賜りましたアークレイ株式会社取締役 山田繁樹氏ならびにアークレイ株式会社研究開発部長 村上淳氏に深く感謝の意を表します。

アークレイ株式会社 大隅孝志氏には、論文作成の間、深い御理解と激励をいただきましたこと、深く感謝いたします。アークレイ株式会社 堀雅貴氏，花房昌弘氏，福家博氏，山本明広氏，須川幸浩氏，高木英紀氏には、研究の当初から共に実験を重ね、多くの議論を持たせていただきました。また、中西直之氏には、論文中の作図について多くの協力をいただきました。これらのすべてが、本研究の遂行に必要なものであり、関係者各位に改めて深く感謝の意を表したいと思います。

最後に、毎日笑顔で送り出してくれた妻 佳代と毎日笑顔で迎えてくれた息子 康太，娘 彩夏に心からの感謝を伝えたいと思います。